

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Valoración de efectos ecotoxicológicos de oxitetraciclina en organismos terrestres y acuáticos mediante el empleo de sistemas multi-especie en suelo (MS3)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Javier Pro González

Director

Arturo Anadón Navarro

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



VALORACIÓN DE EFECTOS
ECOTOXICOLÓGICOS DE OXITETRACICLINA
EN ORGANISMOS TERRESTRES Y
ACUATICOS MEDIANTE EL EMPLEO DE
SISTEMAS MULTI-ESPECIE EN SUELO (MS3)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
FRANCISCO JAVIER PRO GONZALEZ

Bajo la dirección del Profesor Doctor
Arturo Anadón Navarro

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**VALORACIÓN DE EFECTOS
ECOTOXICOLÓGICOS DE OXITETRACICLINA
EN ORGANISMOS TERRESTRES Y
ACUATICOS MEDIANTE EL EMPLEO DE
SISTEMAS MULTI-ESPECIE EN SUELO (MS3)**

TESIS DOCTORAL
FRANCISCO JAVIER PRO GONZALEZ

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**VALORACIÓN DE EFECTOS
ECOTOXICOLÓGICOS DE OXITETRACICLINA
EN ORGANISMOS TERRESTRES Y
ACUATICOS MEDIANTE EL EMPLEO DE
SISTEMAS MULTI-ESPECIE EN SUELO (MS3)**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Toxicología y Farmacología**

FRANCISCO JAVIER PRO GONZALEZ

Madrid, 2015

**VALORACIÓN DE EFECTOS
ECOTOXICOLÓGICOS DE OXITETRACICLINA
EN ORGANISMOS TERRESTRES Y
ACUATICOS MEDIANTE EL EMPLEO DE
SISTEMAS MULTI-ESPECIE EN SUELO (MS3)**

Director:

**Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro
Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria
Facultad de Veterinaria**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Deseo expresar mi agradecimiento,

A mi Director de Tesis Doctoral, Profesor Dr. D. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, y Director del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por todas sus enseñanzas, confianza y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Profesora Dra. Dña. María Rosa Martínez-Larrañaga, Catedrática de Toxicología, que de forma tan generosa ha contribuido con su permanente apoyo y estímulo a que esta Tesis Doctoral pueda ser presentada.

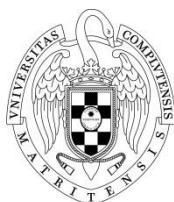
A mis compañeros del Grupo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida, en particular a la Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero y a la Prof. Dra. Irma Ares Lombán que me han animado siempre para la realización y consecución de este trabajo.

A la Dra. Gregoria Carbonell Martín, al Dr. Carlos Fernández Torija por su amable y desinteresada colaboración demostrada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Eulalia María Beltrán, D^a María del Carmen del Río Agudín y D. Manuel Torrijos Garrido por su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

Por último, y no menos importante sino todo lo contrario, a mis padres, hermanos y hermanas, y muy especialmente a Nati y a nuestros hijos, Dora y Nicolás por su paciencia y comprensión.

Trabajo financiado por el Proyecto Ref. UCM-BSGH/ GR3/14 de la
Universidad Complutense de Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**Departamento de Toxicología
y Farmacología**
Facultad de Veterinaria
28040 Madrid

Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA que **D. FRANCISCO JAVIER PRO GONZALEZ**

Ha realizado bajo mi dirección su Tesis Doctoral titulada “**Valoración de Efectos Ecotoxicológicos de Oxitetraciclina en Organismos Terrestres y Acuáticos Mediante el Empleo de Sistemas Multi-especie en Suelo (MS3)**” en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a

16 de octubre de dos mil quince.

Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCION..... | 5 |
| 1.1. El suelo como factor de producción en la agricultura..... | 6 |
| 1.2. Contaminación ambiental por antibióticos..... | 13 |
| 1.2.1. Empleo de antibióticos en ganadería, acuicultura y agricultura..... | 18 |
| 1.3. Oxitetraciclina..... | 22 |
| 1.3.1. Aspectos generales..... | 22 |
| 1.3.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas..... | 26 |
| 1.3.3 Mecanismo de acción y espectro antibacteriano..... | 34 |
| 1.3.4. Resistencias..... | 43 |
| 1.3.5. Indicaciones terapéuticas..... | 48 |
| 1.4. Valoración ecotoxicológica..... | 51 |
| 1.5. Justificación del trabajo y objetivos..... | 65 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 67 |
| 2.1. Protocolo y diseño experimental..... | 68 |
| 2.1.1. Ensayo de inhibición del crecimiento en la planta acuática <i>Lemna minor</i> | 68 |
| 2.1.2. Ensayo de toxicidad en la lombriz de tierra <i>Eisenia andrei</i> | 75 |
| 2.1.3. Ensayo en sistema multi-especie en suelo | 80 |
| 2.1.3.1. Determinación del contenido de humedad y producción de CO ₂ y actividad enzimática del suelo..... | 89 |
| 2.1.3.2. Estudio de la germinación y crecimiento en plántulas terrestres mono- y dicotiledóneas (<i>Triticum aestivum</i> , | |

| | |
|--|------------|
| <i>Brassica napus</i> , <i>Vicia sativa</i>)..... | 92 |
| 2.1.3.3. Estudio de la mortalidad y biomasa en la lombriz de tierra <i>Eisenia andrei</i> | 93 |
| 2.2. Método analítico de oxitetraciclina..... | 95 |
| 2.2.1. Análisis de oxitetraciclina en el medio de crecimiento de la planta acuática <i>Lemna minor</i> | 95 |
| 2.2.2. Análisis de oxitetraciclina en el suelo | 97 |
| 2.2.3. Análisis de oxitetraciclina en la lombriz de tierra (<i>Eisenia andrei</i>) del sistema multi-especie en suelo..... | 100 |
| 2.3. Análisis estadístico..... | 105 |
| 2.4. Reactivos..... | 105 |
| 3. RESULTADOS..... | 108 |
| 3.1. Efectos de oxitetraciclina en el crecimiento de la planta acuática <i>Lemna minor</i>..... | 109 |
| 3.2. Efectos de oxitetraciclina en la lombriz de tierra <i>Eisenia andrei</i>..... | 122 |
| 3.3. Efectos de oxitetraciclina en el sistema multi-especie en suelo..... | 124 |
| 3.3.1. Efectos sobre la producción de CO ₂ y actividad enzimática del suelo..... | 124 |
| 3.3.2. Efectos sobre la germinación y crecimiento en plántulas terrestres mono- y dicotiledóneas (<i>Triticum aestivum</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Vicia sativa</i>)..... | 125 |
| 3.3.3. Efectos sobre la mortalidad y biomasa en la lombriz de tierra <i>Eisenia andrei</i> | 128 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 131 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 136 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 140 |

RESUMEN

La importancia del suelo radica en las numerosas funciones que desempeña, tanto ambientales como socio-económicas y culturales. El suelo es el fundamento del sistema alimentario, la base de la agricultura y el medio en el que crecen casi todas las plantas destinadas a la producción de alimento, es un recurso prácticamente no renovable y es un medio vivo con gran biodiversidad cuya actividad biológica contribuye a determinar la estructura y fertilidad, y resulta ser fundamental para que este pueda realizar algunas de sus funciones. La incorporación al suelo de agentes contaminantes químicos o abióticos por encima de su capacidad de amortiguación supone su contaminación y en consecuencia la contaminación de las aguas subterráneas y/o superficiales. La presencia en el suelo de elementos tóxicos puede suponer un riesgo para la salud humana y/o los ecosistemas

La presencia de medicamentos en el medio ambiente se ha convertido en un tema muy actual de investigación. Las técnicas cromatográficas actuales permiten alcanzar límites de detección analítica, en rangos comprendidos entre ng/l a µg/l, lo que ha permitido cuantificar un gran número de principios activos de uso farmacológico y excipientes en el medio ambiente, obligando a la comunidad científica a considerar este tipo de contaminación como un potencial problema que merece su atención. Hoy en día, se conoce, su amplia difusión a bajas concentraciones principalmente en el medio ambiente acuático. Tales concentraciones se han detectado en los compartimentos acuáticos, tales como los influentes y efluentes de plantas depuradoras de aguas residuales (EDAR), las aguas superficiales (ríos, lagos, arroyos, y estuarios, entre otros), el agua de mar, las aguas subterráneas y el agua potable.

La comunidad científica, en general, está de acuerdo con la posibilidad de que los efectos adversos derivados de la presencia de los medicamentos no sólo puedan afectar la salud humana, sino también a los organismos acuáticos y terrestres.

Los estudios de seguimiento realizados tanto en Europa como en Norteamérica, indican la presencia de concentraciones significativas de diferentes medicamentos veterinarios en suelos agrícolas fertilizados con purines y estiércoles, y de medicamentos de uso humano y veterinario en las aguas, incluso a distancias considerables de los puntos de vertido de efluentes

Los antibióticos son una de las clases de agentes farmacológicos más exitosos utilizados en terapéutica humana. Sin embargo, puesto que pueden desafiar a las poblaciones microbianas, deben ser considerados también como contaminantes importantes. Además de ser utilizado

para la terapia humana, los antibióticos se usan en la cría animal y con fines agrícolas. La consecuencia más clara de la liberación de los antibióticos al medio ambiente es el originar bacterias resistentes a antibióticos, sin embargo, el efecto de los antibióticos sobre la biosfera es más amplio que todo esto y puede tener impacto sobre la estructura y la actividad de la microbiota; por lo tanto hay que tener en cuenta siempre el posible impacto que la contaminación por antibióticos puede tener para la salud humana y los sistemas terrestres y acuáticos

Estudios realizados en la Unión Europea, indican que las tetraciclinas son uno de los medicamentos antibacterianos más utilizados y que después de la aplicación de estiércol animal semilíquido a suelos agrícolas se detecta su presencia; asimismo, estudios realizados en sedimentos procedentes de la acuicultura detectan la presencia del antibiótico oxitetraciclina y muestran una semivida de permanencia superior a 30 días.

El estudio que se presenta muestra la valoración del impacto ambiental del antibiótico oxitetraciclina en el medio acuático y terrestre, mediante el empleo de ensayos ecotoxicológicos propuestos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la valoración de efectos de efectos en plantas acuáticas (*Lemna minor* L.) y en invertebrados terrestres (lombriz de tierra: *Eisenia andrei* B.).

Además de estos ensayos, este trabajo propone la utilización de un sistema multi-especie en suelo, diseño experimental que simula un microcosmos terrestre, y en el que se introducen, además de los microorganismos que nos provee el suelo agrario de ensayo, 3 variedades de plantas terrestres mono- y dicotiledóneas (*Triticum aestivum*, *Brassica napus* y *Vicia sativa*) y un invertebrado terrestre (*Eisenia andrei* B.).

El compartimento acuático es el destino final de la mayoría de las sustancias contaminantes y por ello se inicia una valoración inicial del efecto y comportamiento de oxitetraciclina en el medio acuático, empleando para ello el ensayo de inhibición del crecimiento en la planta acuática *Lemna minor* propuesto por la OECD.

La vía principal de entrada del antibiótico al compartimento terrestre es la aplicación directa de las deyecciones ganaderas tanto sólidas como líquidas como fertilizante agrario al suelo, pudiendo llegar el antibiótico por esta vía a cauces fluviales.

La vía de entrada de oxitetraciclina al compartimento acuático es a través de los efluentes de depuradora y efluentes de piscifactoría no debidamente tratados.

La introducción del ensayo con sistema multi-especie en suelo es de gran utilidad para la valoración de los efectos y el comportamiento de la oxitetraciclina en el suelo agrario de ensayo, permitiendo también, la evaluación de los efectos de la oxitetraciclina conjuntamente en invertebrados terrestres (*Eisenia andrei*), sobre la producción de CO₂ y la actividad enzimática deshidrogenasa en las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo y finalmente la valoración del efecto de oxitetraciclina sobre tres especies de plantas terrestres.

SUMMARY

The importance of soil lies in the many roles that it plays environmentally, socio-economically and culturally. The soil is the base of the feeding system, the base of agriculture, and the environment where most plants used to feed animals grow; it is practically a non-renewable resource and it is a life environment with a great biodiversity, its biological activity contributes to determine the structure and fertility, and it is mandatory so that it can serve these purposes. Chemical or abiotic polluting agents integrated into the soil over its mitigating capacity may result in pollution of underground or surface water. The presence of toxic elements in the soil may constitute a threat to the ecosystems and human health.

The presence of drugs in the environment has gained researchers attention. Current chromatographic techniques allow detection levels in the range of ng/l to µg/ml, which has allowed to quantify a large number of pharmacologically active substances and excipients in the environment, making the scientific community to consider this type of pollution as a potential problem which deserves attention. Nowadays, it is known its large diffusion to low concentrations mainly in the aquatic environment. Such concentrations have been detected in the aquatic compartments such as influents and effluents of residual water sewage plants, superficial waters (rivers, lakes, creeks, estuaries, among others), sea water, underground water and drinkable water.

The scientific community in general, agrees that the adverse effects derived from the presence of drug pollutants, may affect not only human health but also aquatic and terrestrial organisms.

Tracing studies developed both in the European Union and North America, show the presence of significant concentrations of different veterinary drugs in agricultural fertilized fields with purines and manures; and human and veterinary drugs in the water, even at a considerable distance from the original landfill of waste point.

Studies performed in The European Union show that tetracyclines are one of the most widely used antibacterial drugs and that after the half-liquid animal manure applied to the agricultural soil, its presence is detected; likewise studies performed in sediments from aquaculture may detect the antibiotic oxytetracycline and may show residency half-life greater than 30 days.

The research work that is presented shows the environmental impact assessment of oxytetracycline in the aquatic and terrestrial environment through ecotoxicological assays proposed by the Organisation for the Economy, Cooperation and Development (OECD) for the assessment of effects in aquatic plants (*Lemna minor* L.) and in terrestrial invertebrates (earth worm: *Eisenia andrei* B.).

In addition to these assays, this research proposes a multi-species system in the soil, a experimental design that resembles a terrestrial microcosm and in which -in addition to the microorganisms that the agricultural assay soil provides- 3 terrestrials plant species mono and dicotyledoneae (*Triticum aestivum*, *Brassica napus* and *Vicia sativa*) and a terrestrial invertebrate (*Eisenia andrei* B.).

The aquatic compartment is the final fate of most contaminants therefore an initial assessment of the effect and oxytetracycline behaviour in the aquatic environment, using the growth inhibition in the aquatic plant *Lemna minor* as proposed by OECD.

The main route of exposure by which the antibiotic enters the terrestrial compartment is the direct application of farming manure, both solid and liquid, as an agricultural soil fertilizer, which could allow the antibiotic onto surface waters. The main route of exposure by which oxytetracycline reaches the aquatic compartment is through effluents from waste water treatment plants from continental aquaculture not adequately treated.

The introduction of a multi species soil system assay is of great interest in order to assess the effects and behavior of the oxytetracycline in the agricultural assay soil, also enabling the assessment of the effects of oxytetracycline in terrestrial intervertebrates (*Eisenia andrei*), over the CO₂ production and the dehydrogenase enzyme activity in the microorganism population present in the soil and finally the assessment of the oxytetracycline over three species of terrestrial plants.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El suelo como factor de producción en la agricultura

El suelo es un factor de producción esencial en la agricultura. Además de actuar como soporte físico de los cultivos, proporcionándoles los nutrientes, el aire y el agua que precisan. El suelo agrícola es un recurso inestimable y limitado, cuyo potencial agronómico actual se debe a la labor desarrollada por el hombre durante muchos siglos. La degradación irreversible de este recurso supone no sólo destruir el bien máspreciado de los agricultores, sino hipotecar las oportunidades agrícolas de generaciones futuras. Por este motivo, la protección del suelo constituye un objetivo prioritario, para garantizar su fertilidad y su valor agronómico, presente y futuro. La aparición de nuevas sustancias y productos químicos no debe ser óbice para que se olviden sus posibles repercusiones sobre la salud y la seguridad de las personas y de los animales, y del medio ambiente, por lo que procede regular la utilización de nuevos ingredientes en la elaboración de productos químicos, de modo que eviten sus posibles efectos nocivos en el agua, el suelo, la flora, la fauna y el ser humano.

El suelo es un recurso vital y en gran parte no renovable que está sometido a una presión cada vez mayor. La capacidad de almacenaje, filtración, amortiguación y transformación convierte al suelo en uno de los principales factores para la protección del agua y el intercambio de gases con la atmósfera. Además, constituye un hábitat y una reserva genética, un elemento del paisaje y del patrimonio cultural así como una fuente de materias primas (CE, 2002). Para que el suelo pueda desempeñar sus numerosas funciones, es necesario mantener, por lo tanto, un estado saludable del suelo. No obstante, hay pruebas que evidencian que el suelo puede estar cada vez más amenazado por una serie de actividades humanas que podrían contribuir a su degradación. La fase final del proceso de degradación consiste en la desertificación, fenómeno que se da cuando el suelo pierde la capacidad de realizar sus funciones. El suelo se enfrenta, entre otras, a las siguientes amenazas: erosión, disminución de la materia orgánica, contaminación difusa y local, sellado, compactación del suelo, pérdida de biodiversidad y salinización; es probable que también el cambio climático empeore la situación.

Conforme a lo establecido por la Organización Internacional de Normalización (ISO. 1996), en su norma ISO 11074-1, define generalmente al suelo como la capa superior de la corteza terrestre. El suelo está compuesto de partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos, y es la interfaz entre la tierra (geosfera), el aire (atmósfera) y el agua (hidrosfera).

Se ha indicado que el reto para el futuro, consistirá en hacer posible que los diferentes usos del suelo puedan desarrollarse de una forma sostenible sin poner en peligro este recurso natural, escaso y no renovable, que no es fácilmente reparable y que resulta cada vez más afectado por la actividad antrópica que perturba sus características físico-químicas y biológicas y llega en algunas ocasiones a producir alteraciones graves. (CAM, 2015)

La importancia del suelo radica en las numerosas funciones que desempeña, tanto ambientales como socio-económicas y culturales. El documento de la Comisión Europea (CE, 2002) denominado “*Hacia una estrategia temática para la protección del suelo*” define las principales funciones del suelo, que en resumen son:

- Es fuente de alimentos y producción de biomasa.
- Constituye uno de los principales factores para la protección del agua y del intercambio de gases con la atmósfera.
- Constituye el hábitat de numerosos organismos, desempeñando funciones ecológicas esenciales.
- Sirve de base a las actividades humanas, y constituye un elemento del paisaje y del patrimonio cultural de la humanidad.
- Es fuente de materias primas.

Algunas de las características que diferencian el suelo de otros recursos son las siguientes:

- Es un recurso prácticamente no renovable, con una cinética de degradación relativamente rápida, y tasas de formación y regeneración extremadamente lentas.
- Tiene una gran capacidad de almacenamiento y amortiguación, debida en gran parte a su contenido en materia orgánica. Dicha capacidad está relacionada tanto con el agua, los minerales y los gases como con un gran número de contaminantes químicos. Cuando se superan los umbrales de irreversibilidad de almacenamiento y amortiguación de las sustancias químicas en el suelo, se produce su liberación y distribución en otros compartimentos medioambientales.

- Es un medio vivo con gran biodiversidad. La actividad biológica contribuye a determinar la estructura y fertilidad del suelo, y resulta fundamental para que pueda realizar algunas de sus funciones.
- A diferencia del aire y el agua, el suelo es un recurso que está generalmente sujeto a derechos de propiedad.

En el ámbito de la Unión Europea (UE), la degradación del suelo (entendida como la pérdida de la capacidad de realizar las funciones que le son propias) tiene actualmente las siguientes causas principales: la erosión, la pérdida de materia orgánica, la contaminación, el sellado, la compactación, la reducción de la biodiversidad, la salinización y ciertas catástrofes naturales (inundaciones y deslizamientos de tierras).

Dado que muchas de estas causas se dan simultáneamente en numerosos suelos, la consecución de una política en favor de la sostenibilidad del suelo exige la adopción de una estrategia integrada para su protección. En particular, la incorporación al suelo de agentes contaminantes químicos o abióticos por encima de su capacidad de amortiguación supone la contaminación del mismo y la posible contaminación de las aguas subterráneas. La presencia en el suelo de elementos tóxicos supone para la salud humana y/o los ecosistemas un riesgo, que de ser no aceptable, exige la implantación de medidas correctoras acordes con las características del proceso. La acumulación de sustancias tóxicas en el suelo tiene con frecuencia un origen antrópico, pero también puede ocurrir de manera natural.

La preocupación explícita por la degradación y conservación del suelo por parte de Organismos Internacionales se remonta a unos años atrás. La Carta Europea de los Suelos, aprobada por el Consejo de Europa en 1972 (CE, 1972), y la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano (PNUMA, 1972) empiezan a poner de manifiesto la preocupación por la degradación y contaminación del suelo como consecuencia del desarrollo humano. La Carta Mundial de los Suelos (FAO, 1981) y la Política Mundial del Suelo (PNUMA, 1982) persiguen el fomento de la cooperación internacional para el uso racional del recurso suelo y reflejan la preocupación por su degradación. En ellas se establecen los principios de actuación para la explotación de los suelos de forma sostenible y las directrices para la formulación de políticas nacionales. Además, la Cumbre de Río de Janeiro (1992) ha marcado un hito histórico en cuanto al compromiso internacional en el ámbito de la protección del medio ambiente. En el marco de esta Cumbre se desarrolló el Convenio sobre la Diversidad Biológica, estableciendo un compromiso de conservación de la diversidad

biológica y de la utilización sostenible de sus componentes (entre los que se encuentra el suelo) y de los recursos genéticos.

La importancia de los ecosistemas terrestres queda recogida igualmente en la Convención Marco sobre el Cambio Climático (1992), en la que se reconoce su papel como sumideros de gases de efecto invernadero y se señala que la degradación del suelo y sus cambios de uso inciden negativamente en el aumento global de las emisiones de gases de efecto invernadero. En esa misma línea, el Protocolo de Kioto (Naciones Unidas, 1998) promueve el desarrollo sostenible e invita a todas las partes a aplicar políticas y medidas de protección y aumento de los sumideros de gases de efecto invernadero.

En cuanto a las problemáticas específicas de la erosión de los suelos y de la pérdida de suelo agrícola a nivel mundial, la Convención de Lucha contra la Desertificación y la Sequía (1994) marcó como objetivo prevenir y reducir la degradación del suelo, rehabilitar las zonas que están parcialmente degradadas y recuperar las que se hayan desertificado. Es evidente, la conciencia de la comunidad internacional respecto a la necesidad de proteger el suelo, como lo ponen de manifiesto las iniciativas y compromisos políticos y legales, así como las políticas públicas para la protección de los recursos y del medio ambiente (Nairobi 1997, Malmö 2000, Johannesburgo 2002).

En el ámbito de la UE, aunque muchas de sus políticas afectan al suelo y algunas de ellas velan por su protección (aun no siendo éste su objetivo principal), todavía no existe una legislación europea específica para la protección del mismo. A este respecto las políticas más importantes son, entre otras, las de medio ambiente, agricultura, desarrollo regional, transporte, investigación y desarrollo. También cabe resaltar que el Sexto Programa de Acción Comunitario en Materia de Medio Ambiente (Decisión 1600/2002/CEE), instó a la elaboración de una estrategia temática sobre la protección de los suelos (*«la estrategia»*), que hace especial hincapié en prevenir la contaminación, la erosión, la desertización, la degradación del suelo, la ocupación de terrenos y los riesgos hidrogeológicos.

La Comunicación de la Comisión Europea (CE, 2002), *“Hacia una estrategia temática para la protección del suelo”*, es la primera que aborda de forma específica esta cuestión. La Comisión Europea señalaba las principales amenazas que afectan a los suelos de la UE: la erosión, la pérdida de materia orgánica, la contaminación, la salinización, la compactación, la

pérdida de la biodiversidad del suelo, el sellado, los deslizamientos de tierras y las inundaciones.

La Directiva 2004/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril de 2004, sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales, establece un marco de responsabilidad medioambiental basado en el *principio de «quien contamina paga»* para la prevención y la reparación de los daños medioambientales, especificando los daños al suelo (es decir, cualquier contaminación del suelo que suponga un riesgo significativo de que se produzcan efectos adversos para la salud humana debidos a la introducción directa o indirecta de sustancias, preparados, organismos o microorganismos en el suelo o el subsuelo). En este sentido obliga a realizar una acción preventiva y una acción reparadora de los daños al suelo.

Con respecto a “*la estrategia*” el Sexto Programa de Acción Comunitario en Materia de Medio Ambiente (Decisión 1600/2002/CEE) insta a elaborar, la Comunicación de la Comisión Europea (CE, 2006), de la “*Estrategia temática para la protección del suelo*”; desarrolla la misma con el objetivo de la protección y la utilización sostenible de los suelos, en función de los siguientes principios rectores: (1) prevención de la degradación del suelo, (2) conservación de sus funciones y (3) restauración del suelo degradado para devolverle un nivel de funcionalidad que corresponda al menos a su utilización actual y prevista. Por último resaltar que el Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico 2007-2013 (Decisión 1982/2006/CE) incluye un capítulo que permite apoyar las actuaciones de investigación sobre la protección y las funciones del suelo.

Un ecosistema saludable puede proporcionar variados servicios que van en provecho de los bienes públicos, tales como agua limpia, reciclado de nutrientes, control del clima y seguridad alimentaria, y que contribuyen directa o indirectamente al bienestar humano. Sin embargo, hoy en día hay muchos ecosistemas que están en declive; esta situación tiene particular importancia para la agricultura, un sector que depende de los servicios del ecosistema. Se ha señalado que la pérdida de ecosistemas saludables afectará gravemente a la producción de alimentos, tanto en el presente como en el futuro. (FAO, 2011)

Suelos saludables

Según la FAO (FAO, 2015b) se define un suelo saludable como “la capacidad continua del suelo de funcionar como un sistema vivo vital, dentro de los límites de los ecosistemas y

del uso de la tierra, para sostener la productividad biológica, promover la calidad del aire y el agua, y mantener la salud vegetal, animal y humana”. Los suelos saludables son la base para la producción de alimentos saludables ya que se estima que el 95% de nuestros alimentos se producen directa o indirectamente en nuestros suelos. Y, son el fundamento del sistema alimentario; la base de la agricultura y el medio en el que crecen casi todas las plantas destinadas a la producción de alimentos. Los suelos saludables producen cultivos sanos que dan alimento al hombre y a los animales; de hecho, la calidad de los suelos está directamente relacionada con la calidad y la cantidad de alimentos.

Un suelo saludable es un ecosistema vivo y dinámico, lleno de organismos microscópicos y de mayor tamaño que cumplen muchas funciones vitales, entre ellas transformar la materia inerte, así como los minerales, en nutrientes para las plantas (ciclo de los elementos nutritivos); controlar las enfermedades de las plantas, los insectos y las malas hierbas; mejorar la estructura de los suelos con efectos positivos para la capacidad de retención de agua y nutrientes de los suelos y, por último, mejorar la producción de cultivos. Además, los suelos sanos contribuyen a mitigar el cambio climático al mantener o aumentar su contenido de carbono.

Con una población mundial que según las previsiones superará los 9.000 millones de habitantes en 2050, y el agravante de la competencia por la tierra y el agua y el impacto del cambio climático, nuestra seguridad alimentaria actual y futura depende de nuestra capacidad de aumentar los rendimientos y la calidad de los alimentos utilizando los suelos ya dedicados a la producción actual. El mantenimiento de los suelos saludables supone la gestión de la sostenibilidad de la tierra dedicada a la agricultura.

Los sistemas de gestión holística de la producción, que promueven y refuerzan la salud de los agroecosistemas sostenibles desde el punto de vista socio-económico y ecológico, son necesarios para proteger nuestros suelos y mantener capacidades productivas elevadas. Por ello, los agricultores desempeñan un papel primordial a este respecto ya que son los primeros interesados en promover la gestión sostenible de los suelos con la finalidad de mejorar la productividad.

Por último, una mejor comprensión de las relaciones entre el período útil de los suelos y la función de los ecosistemas y el impacto de las intervenciones humanas permitirán reducir los efectos negativos y aprovechar de manera más eficaz los beneficios de la actividad biológica de los suelos con miras a una agricultura más sostenible y productiva.

El suelo es un recurso finito, lo que implica que su pérdida y degradación no son reversibles en el curso de una vida humana (FAO, 2015a). En cuanto a componente fundamental de los recursos de tierras, desarrollo agrícola y la sostenibilidad ecológica, el suelo es la base para la producción de alimentos, materias primas para piensos, combustibles y fibras, y otros servicios ecosistémicos esenciales. Sin embargo, pese a que es un recurso natural muy valioso, a menudo no se le presta la debida atención. La superficie natural de suelos productivos es limitada y se encuentra sometida a una creciente presión debido a la intensificación y el uso competitivo que caracteriza el aprovechamiento de los suelos con fines agrícolas, forestales, pastorales y de urbanización, y para satisfacer la demanda de producción de alimentos, energía y extracción de materias primas. Por lo tanto, los suelos deben ser reconocidos y valorados por sus capacidades productivas y por su contribución a la seguridad alimentaria y al mantenimiento de servicios ecosistémicos fundamentales. En definitiva, el suelo es un recurso no renovable, y su conservación es esencial para el abastecimiento alimentario y nuestro futuro sostenible

Se conoce que, el 33% de la tierra está moderada o altamente degradada debido a la erosión, la salinización, la compactación, la acidificación y la contaminación de los suelos por sustancias químicas. La tasa actual de degradación de los suelos amenaza la capacidad de las generaciones futuras de atender sus necesidades más básicas. Se estima que para el año 2050 las tendencias demográficas y el crecimiento previsto de la población mundial superare los 9.000 millones de personas, lo que dará lugar a un aumento del 60% de la demanda de alimentos, piensos y fibras. Por tanto, el manejo sostenible de los suelos agrícolas del mundo y la producción sostenible son imprescindibles para invertir la tendencia de degradación de los suelos y garantizar la seguridad alimentaria actual y futura del mundo. Las predicciones para el año 2050, son que la producción agrícola deberá aumentar un 60% a nivel mundial y cerca de un 100% en los países en desarrollo, solamente para atender la demanda de alimentos. Otros datos señalan que, el 33% de los suelos está de moderada a altamente degradado debido a la erosión, agotamiento de nutrientes, acidificación, salinización, compactación y contaminación química. La falta de uno de los 15 macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas puede limitar el rendimiento del cultivo. En la mayoría de los países en desarrollo existe poco margen para ampliar las tierras cultivables; en Asia meridional, en el Cercano Oriente y África del Norte prácticamente no existen tierras disponibles sin cultivar. En el África subsahariana y en América Latina sí existen tierras disponibles, pero más del 70% sufre limitaciones relativas al suelo y al terreno. Y finalmente, se indica que el uso más eficiente del agua, la reducción del empleo de plaguicidas y la

mejora de la salud del suelo pueden dar lugar a un aumento medio del rendimiento de los cultivos del 79%.

1.2. Contaminación ambiental por antibióticos

La presencia de medicamentos en el medio ambiente se ha convertido en un tema muy actual de investigación. Inicialmente, el problema se puso de relieve en los EE.UU. en los años 1970 y casi una década más tarde en el Reino Unido. Sin embargo, no fue hasta mediados de los 90 y gracias a los avances en las técnicas de análisis cuando aumento el conocimiento sobre la contaminación ambiental por medicamentos. Las técnicas cromatográficas actuales permiten alcanzar límites de detección analítica, en rangos comprendidos entre ng/l a µg/l, lo que ha permitido a los investigadores cuantificar un gran número de principios activos de uso farmacológico y excipientes en el medio ambiente, obligando a la comunidad científica a considerar este tipo de contaminación como un potencial problema que merece su atención. De hecho, anualmente se producen toneladas de medicamentos en todo el mundo para ser consumidos por el hombre y los animales. Están concebidos principalmente para que su modo de acción resista a la inactivación o degradación antes de ejercer su efecto terapéutico en el lugar de acción. Sin embargo, estas mismas propiedades son paradójicamente responsables de su bioacumulación y efectos tóxicos en los ecosistemas acuáticos y terrestres. De manera diferente a algunos contaminantes convencionales (tales como plaguicidas, detergentes, y combustibles, entre otros), los medicamentos son continuamente liberados a niveles bajos, que podrían dar lugar a toxicidad incluso sin tener altas tasas de persistencia. Hoy en día, se conoce, su amplia difusión a bajas concentraciones principalmente en el medio ambiente acuático. Tales concentraciones se han detectado en los compartimentos acuáticos, tales como los influentes y efluentes de plantas depuradoras de aguas residuales (EDAR), las aguas superficiales (ríos, lagos, arroyos, y estuarios, entre otros), el agua de mar, las aguas subterráneas y el agua potable (Santos *et al.*, 2010).

La comunidad científica, en general, está de acuerdo con la posibilidad de que los efectos adversos derivados de la presencia de los medicamentos no sólo puedan afectar la salud humana, sino también a los organismos acuáticos.

Se ha demostrado que se producen efectos, casi insignificantes, por la exposición continua durante el ciclo de vida de los vertebrados y los invertebrados acuáticos a

concentraciones sub-terapéuticas de medicamentos. Estos efectos se acumulan lentamente hasta manifestarse en una situación irreversible final que con frecuencia únicamente es advertida varias generaciones más tarde, afectando la sostenibilidad de las poblaciones de organismos acuáticos.

Los estudios de seguimiento realizados tanto en Europa como en Norteamérica, indican la presencia de concentraciones significativas de diferentes medicamentos veterinarios en suelos agrícolas fertilizados con purines y estiércoles, y de medicamentos de uso humano y veterinario en las aguas, incluso a distancias considerables de los puntos de vertido de efluentes (Halling-Sørensen *et al.*, 2001).

Las **Figuras 1 y 2** señalan el origen y destino de los medicamentos de uso humano y de uso veterinario en el medio ambiente.

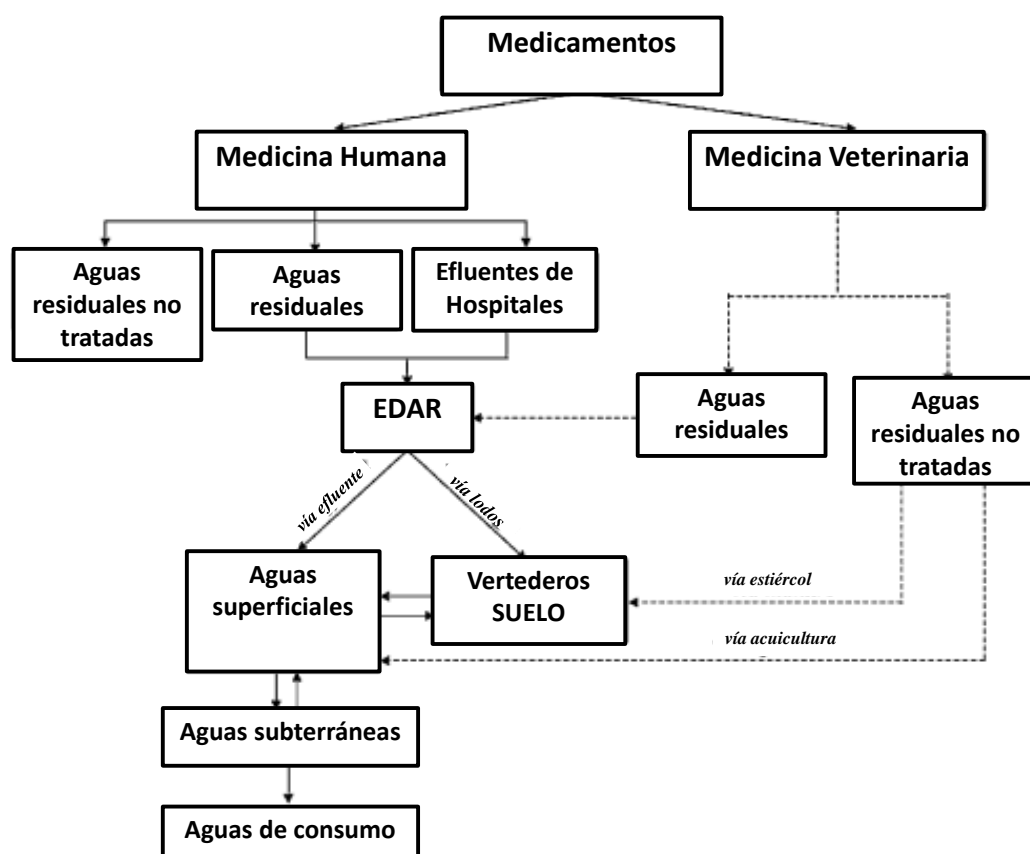


Figura 1. Fuentes y destino de los medicamentos en el medio ambiente (Kümmerer, 2001; Santos *et al.*, 2010)

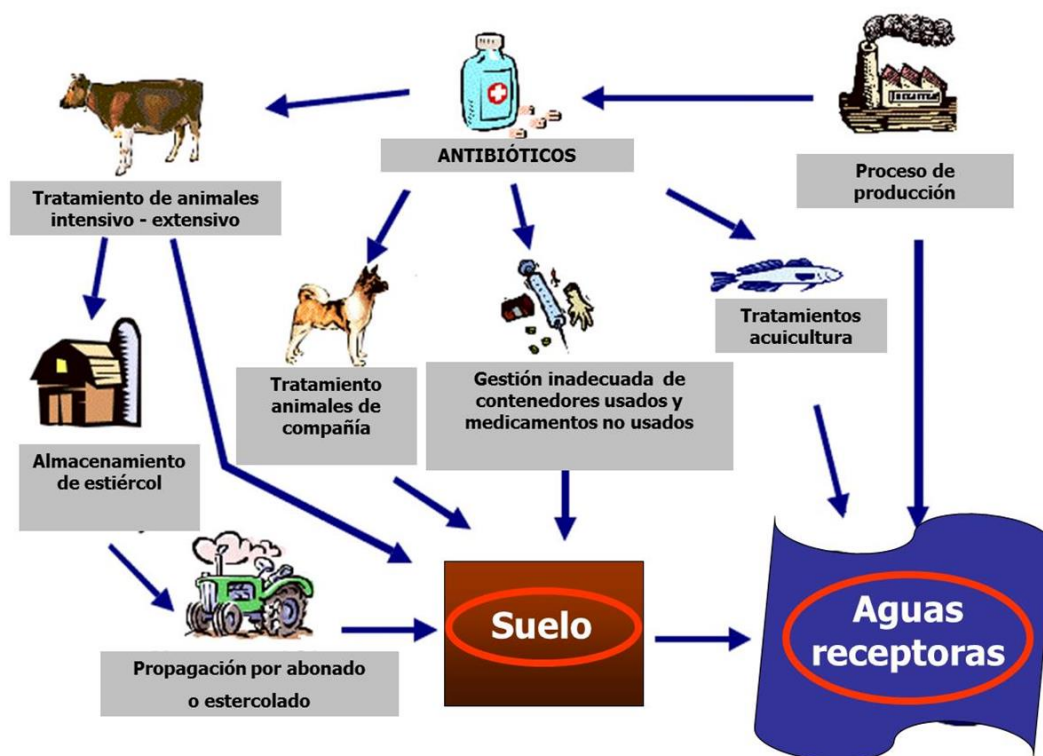


Figura 2. Posibles vías de entrada de los medicamentos veterinarios en los suelos y el agua (USGS, 2015).

Los antibióticos son una de las clases de agentes farmacológicos más exitosos utilizados en terapéutica humana. Sin embargo, puesto que pueden desafiar a las poblaciones microbianas, deben ser considerados también como contaminantes importantes. Además de ser utilizado para la terapia humana, los antibióticos se usan en la cría animal y con fines agrícolas. Los residuos generados a partir de las actividades humanas y de las granjas por el uso terapéutico, estos contienen con cierta frecuencia no solo los antibióticos sino los genes de resistencia antibiótica que a su vez contaminar nuestro medio ambiente. La consecuencia más clara de la liberación de los antibióticos al medio ambiente es el originar bacterias resistentes a antibióticos. Los mismos genes de resistencia encontrados en el entorno clínico difunden actualmente entre los ecosistemas prístinos aunque no exista constancia de la

contaminación por antibióticos. Sin embargo, el efecto de los antibióticos sobre la biosfera es más amplio que todo esto y puede tener impacto sobre la estructura y la actividad de la microbiota; por lo tanto hay que tener en cuenta siempre el posible impacto que la contaminación por antibióticos o por genes de resistencia a antibióticos puede tener para la salud humana y para la evolución de las poblaciones microbianas medioambientales. Es importante destacar que varias clases de antibióticos son producidas de forma natural en nuestro medioambiente. Por el contrario, los genes de resistencia a antibióticos, pueden ser adquiridos por bacterias patógenas a través de la transferencia horizontal de genes y en bacterias localizadas en el medioambiente, aunque estas pueden evolucionar con una mayor resistencia cuando el hombre es tratado de infecciones con antibióticos con lo que origina una mayor presión de selección sobre los microorganismos (Davies, 1997).

La situación relativa a los antibióticos y sus resistencias se asemeja en algunos aspectos a la contaminación por metales pesados. Al igual que los antibióticos, los metales pesados son compuestos naturales presentes en diferentes ecosistemas. Sin embargo, la utilización de los metales pesados por el hombre ha aumentado su presencia en el medio ambiente, dando lugar a cambios en los ecosistemas contaminados. Los antibióticos a diferencia de los metales pesados que desafían todas las formas de vida, alteran fundamentalmente la microbiosfera y probablemente debido esto, han recibido menos atención las consecuencias de la contaminación antibiótica sobre la biodiversidad.

El grado de entendimiento de la resistencia a metales pesados en ecosistemas naturales puede ayudar también entender la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente. Los elementos que intervienen en la resistencia a metales pesados se codifican en los cromosomas bacterianos de bacterias como la *Ralstonia metallidurans* (Mergeay *et al.*, 2003). Estas bacterias suelen estar bien adaptadas para sobrevivir en hábitats naturales ricos en metales pesados (por ejemplo, suelos volcánicos), sin embargo, la fuerte presión de selección debido a la contaminación antropogénica ha hecho que estos determinantes cromosómicamente codificados estén presentes en las unidades de transferencia de genes, de tal modo que pueden propagarse entre poblaciones bacterianas (Nies, 2003). Del mismo modo, los genes de resistencia a antibióticos presentes de forma natural en los cromosomas de las bacterias localizadas en el medio ambiente (Fajardo y Martínez, 2008) están ahora presentes en forma de plásmidos que pueden transferirse a agentes patógenos humanos. Se ha puesto de relieve que el contacto de las bacterias de la microbiota del hombre con microorganismos procedentes de plantas depuradoras de agua o de ecosistemas naturales son una característica importante para comprender la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a patógenos

humanos (Baquero *et al.*, 2008). Una cuestión clave para este hecho emergente será la integración de los genes de resistencia a antibióticos en elementos de transferencia de genes (por ejemplo, plásmidos), un rasgo que se ve favorecido por la liberación de los antibióticos en los ecosistemas naturales (Cattoir *et al.*, 2008).

El contacto de la microbiota humana con otros tipos de microbiota en diferentes ecosistemas (desde la microbiota de los animales hasta los sedimentos de las aguas subterráneas) incrementan la posibilidad de variación genética y la posible aparición de nuevos mecanismos de resistencia que se vuelven a introducir en el ser humano a través del medioambiente (Baquero *et al.*, 2008). La propagación de genes de resistencia en ecosistemas naturales puede desafiar la dinámica y la fisiología de las poblaciones microbianas. Varios informes indican que los genes de resistencia asociados a la microbiota en animales o en el hombre se encuentran en medioambientes sin contaminación antibiótica. En algunas ocasiones, los genes se encuentran en bacterias de origen humano/animal.

Mecanismos de resistencia

Existen numerosos mecanismos a través de los cuales las bacterias pueden desarrollar resistencia antibiótica. Todos ellos implican un cambio en las proteínas producidas por la célula e incluyen: alteración en los lugares de unión ribosomal (perdida o disminución de la afinidad por la diana), sobreexpresión del gen (por ejemplo, síntesis de enzimas que detoxican el antibiótico tales como la β -lactamasas), cambios en el lugar-diana de unión (por ejemplo, alteración en las proteínas de unión a la penicilina), impermeabilidad, en especial la disminución del número o diámetro de la porina (poro en la membrana externa) en bacterias Gram-negativas, y eflujo de antibióticos fuera de las células mediante bombas dependientes de energía. Estos cambios en la síntesis de proteínas son causados por cambios en el ADN que son mediados por plásmidos, por mutación, por conjugación y por la ingestión de materiales de ADN. Por lo general, se han considerado los mecanismos mediante los cuales se produce la resistencia siendo considerados ser específicos de la clase de antibacteriano y de la especie bacteriana frente a la que el antibacteriano actúa. Sin embargo, hay un número creciente de ejemplos de mecanismos de resistencia a clases de antibacterianos tales como fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A (Long *et al.* 2006).

Las bacterias tienen un sistema eficiente de transferencia de genes capaces de intercambiar y acumular genes de resistencia. Ciertos genes bacterianos, incluyendo los genes que codifican la resistencia pueden moverse entre elementos ADN-cromosómicos y

elementos ADN extra-cromosómicos en bacterias. Estos pueden moverse entre bacterias que pertenecen a la misma o diferente especie o a bacterias del mismo género. Los genes de resistencia antibiótica transportados sobre plásmidos y transposones circulan entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y entre bacterias que habitan en diferentes nichos ecológicos. La transferencia entre especies implica que una vez que se ha desarrollado la transferencia de los genes de resistencia, las bacterias que transportan estos genes permanecen como donadores de genes para otras bacterias (Levy, 1998). Los vehículos más importantes para transferir los genes de resistencia en bacterias son los plásmidos, transposones e integrones.

1.2.1. Empleo de antibióticos en ganadería, acuicultura y agricultura

Desde el año 1950 y en paralelo al desarrollo del uso de antibióticos para el control de enfermedades en el hombre, se fueron empleando en veterinaria para el control de enfermedades que afectaban a los animales de producción (incluida la acuicultura) y de compañía. Los antibióticos se emplean en medicina veterinaria para el tratamiento (individual o colectivo) y el control de varios tipos de enfermedades infecciosas que afectan a las diferentes especies de animales. Los medicamentos veterinarios según su vía de administración se pueden clasificar en orales, inyectables (intravenoso, intramuscular, subcutánea), tópicos, intramamarias, intrauterinas, e intraoculares, entre otros y por su forma farmacéutica o formulación (comprimidos, soluciones orales, polvos orales, premezclas medicamentosas, soluciones para el agua de bebida, y pomadas, entre otras). No obstante, existen peculiaridades en ciertas especies de animales, por ejemplo, en acuicultura los tratamientos se hacen a través del pienso, agua (baño-inmersión), administración parenteral (intramuscular, intraperitoneal y en el seno dorso-medial). Si el medicamento está disponible para varias vías de administración, debe elegirse la más adecuada a las características del paciente(s) y la enfermedad a tratar. La oxitetraciclina se conoce es una de las tetraciclinas que más se usa en animales

Los antibióticos también se usan en agricultura para controlar ciertas enfermedades bacterianas de frutas, vegetales y plantas ornamentales. Por ejemplo, la oxitetraciclina se usa con fines terapéuticos para el control de la indicación del “fuego bacteriano” causado por *Erwinia amylovora* en manzanos, perales y árboles ornamentales, así como la mancha bacteriana producida por *Xanthomonas pruni* en melocotones y nectarinas. Otros usos

incluyen inyecciones en árboles para usos no agrícolas en bosques, plantas ornamentales, árboles no cultivados, arbustos leñosos y palmas (Kümmerer, 2005; EPA, 2009).

Otro riesgo, debido al uso de antibióticos en tratamientos colectivos (profilácticos, metafilácticos o terapéuticos) de animales de producción, es que los antibióticos o sus productos de degradación, pueden entrar en contacto con el medio ambiente terrestre y acuático a través de las deyecciones, cuando estas son empleadas como fertilizante agrario, constituyendo a un potencial peligro para especies no diana. Los antibióticos son liberados al medio ambiente cuando el estiércol (sólido o líquido) de los animales tratados se emplea como fertilizante agrícola. En este caso, existe una exposición directa en los organismos terrestres y una posible exposición indirecta en los organismos acuáticos, debida a fenómenos de lixiviación y escorrentía de los antibióticos y sus productos de degradación (Halling-Sørensen *et al.*, 1998). El suelo, es el primer compartimento ambiental expuesto a los medicamentos veterinarios y sus productos de degradación.

Dado que, las prácticas de recogida, almacenamiento y tratamiento de las excretas animales y su distribución en los suelos agrarios muestran una amplia variación regional (Spaepen *et al.*, 1997), la información disponible sobre la toxicidad medio ambiental de los antibióticos es limitada y muchas veces los ensayos estandarizados se realizan bajo condiciones no realistas (Fernández *et al.*, 2004) por lo que se deduce la necesidad de desarrollar nuevos ensayos ecotoxicológicos que contemplen unas condiciones más reales de exposición, una valoración de efectos en organismos terrestres y acuáticos, y el estudio del destino y comportamiento de los medicamentos de uso veterinario en el medio ambiente.

Utilización prudente de los antimicrobianos en medicina veterinaria

La utilización adecuada de los antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria es uno de los principales ámbitos de la política de la UE pertinentes para abordar el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Es conocido que los antimicrobianos son esenciales para la atención médica y la salud de los animales (domésticos y no domésticos). La utilización de antimicrobianos (por ejemplo, en medicina humana y en medicina veterinaria) puede comportar el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. El riesgo aumenta si los antimicrobianos se utilizan de manera inadecuada, por ejemplo, sin objetivos concretos (como la medicación masiva o la utilización para el tratamiento en microorganismos no susceptibles a los agentes patógenos implicados en la enfermedad), en dosis subterapéuticas,

repetidamente o durante períodos de tiempo inadecuados. Los principios generales para la utilización prudente de los antimicrobianos deben aplicarse sistemáticamente en las granjas y en las consultas veterinarias.

La utilización prudente de los antimicrobianos debe traducirse en una utilización más racional y selectiva, maximizando así el efecto terapéutico y reduciendo al mínimo la resistencia a los antimicrobianos. Teniendo en cuenta la resistencia cruzada y la co-resistencia, que implican que cualquier tipo de exposición a antimicrobianos hace que aumente la resistencia a las bacterias patógenas, el resultado final de la utilización prudente debe ser una reducción general del uso de los antimicrobianos, sobre todo limitando su administración a casos en los que sean realmente necesarios. En estas situaciones, los antimicrobianos deben utilizarse como tratamiento específico y de acuerdo con las mejores prácticas, es decir, en función del diagnóstico clínico y, siempre que sea posible, de los resultados del antibiograma, y utilizando un agente antimicrobiano de espectro estrecho.

El objetivo final es reducir la necesidad de antimicrobianos mediante la prevención de la enfermedad. Las enfermedades e infecciones de los animales deben prevenirse principalmente mediante: medidas de bioseguridad, seguimiento de buenas prácticas de producción y gestión y aplicación de programas de control de enfermedades integrados para reducir al mínimo la aparición de enfermedades y erradicar las enfermedades endémicas.

En general, las siguientes medidas pueden ayudar a prevenir las enfermedades y reducir la necesidad de utilizar antimicrobianos en todas las especies (CE, 2015): (1) aplicar medidas de bioseguridad e higiene (incluidas medidas destinadas a prevenir la introducción de infecciones), tales como: mantener ropa y botas separadas para cada unidad; limitar el acceso; habilitar instalaciones para lavarse y desinfectarse las manos (con jabón líquido, agua caliente y fría) cerca del lugar de trabajo; garantizar una rápida retirada de los animales muertos e impedir el acceso a los mismos; aplicar el sistema de entrada y salida de todos los animales al mismo tiempo en cada unidad; seguir un calendario estricto de limpieza y desinfección; y realizar controles de desinfección regulares; (2) elaborar protocolos claros para la prevención de enfermedades infecciosas y para la higiene y el control de infecciones y habilitarlos en las granjas; (3) mejorar los sistemas de ganadería propiciando condiciones de alojamiento, ventilación y ambientales adecuadas para los animales e instalaciones adecuadas y limpias durante el transporte (por ejemplo, zona de estabulación y vehículos); (4) establecer sistemas de producción integrados que eviten la necesidad de comprar y mezclar poblaciones animales

y transportar animales en un estado de enfermedad desconocido; (5) evitar situaciones de estrés que puedan debilitar el sistema inmunológico de los animales y aumentar su susceptibilidad a las infecciones, por ejemplo, limitar el transporte de los animales, reducir al mínimo el tiempo de transporte y garantizar que se respeta la densidad de población animal recomendada (es decir, evitar el hacinamiento); (6) aplicar otros tratamientos zootécnicos que reduzcan al mínimo las enfermedades y reduzcan la utilización de antimicrobianos; (7) introducir planes de salud específicos para grupos de animales diseñados para lograr una mejora gradual coherente de la salud de los rebaños y evitar y desalentar los programas de salud en los que los animales sean tratados sistemáticamente con antimicrobianos de manera profiláctica; (8) aplicar programas para controlar enfermedades animales específicas (tanto víricas como bacterianas) por medio de la vacunación; (9) utilizar alternativas a los antimicrobianos científicamente probadas, eficaces y seguras; (10) utilizar solo piensos y agua seguros y de alta calidad; (11) proporcionar incentivos a los granjeros que les animen a adoptar medidas preventivas eficaces, a mejorar los niveles de salud y bienestar animal y a hacer un seguimiento de los agentes patógenos y su sensibilidad en el rebaño, con el objetivo final de garantizar la utilización basada en pruebas de los antimicrobianos en rebaños individuales de acuerdo con los principios de utilización prudente establecidos en estas directrices.

Tetraciclinas

Datos del Reino Unido y de Holanda sobre el uso de medicamentos, llevados a cabo durante el 1998, indican que las tetraciclinas son los medicamentos antibacterianos más utilizados (Boxall *et al.* 2004).

Estudios realizados en Alemania indican la presencia de medicamentos veterinarios en suelos abonados con estiércol animal. En un primer estudio, las muestras de suelo, recogidas dos días después de un abonado con estiércol semilíquido en ocho zonas con producción animal intensiva, dieron como resultado la detección en los primeros 10 cm de suelo de concentraciones comprendidas entre 9-12 µg/kg de clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina. Las concentraciones de las tres tetraciclinas detectadas disminuyen según la profundidad a la que se obtienen las muestras para análisis, hasta aproximadamente 1 µg/kg por debajo de los 60 cm (Hamscher *et al.* 2000a).

Un segundo estudio, en 12 diferentes suelos agrícolas, realizado cuatro a cinco meses después de la aplicación de estiércol animal semilíquido (Hamscher *et al.* 2000b), se detectó la presencia de tetraciclina y clortetraciclina en los 30 primeros centímetros de casi todas las

muestras; la concentración de tetraciclina se encontraba entre 20-40 µg/kg (Hamscher *et al.* 2000c) y los niveles de clortetraciclina se encontraban por debajo de 5 µg/kg aunque existía en una muestra un máximo de concentración de 41,8 µg/kg, detectado a la profundidad de 0-10 cm.

En Noruega, en muestras de sedimentos procedentes de la acuicultura se detectó oxitetraciclina en un rango comprendido entre 0,1-4,9 mg/kg de materia seca (Jacobsen y Berglind, 1988).

Según una clasificación de la persistencia de medicamentos veterinarios en estiércol, el grupo químico de las tetraciclinas (sin especificar ninguna tetraciclina en concreto), con una semivida en estiércol de 100 días, se clasificaría como muy persistente (tiempo de disipación > de 50 días) (Boxall *et al.*, 2004). La oxitetraciclina persiste en sedimentos con una semivida de permanencia superior a 30 días (Boxall *et al.*, 2004)

Otro estudio sobre la influencia del abonado en el comportamiento, destino y efectos de la oxitetraciclina (Boleas *et al.*, 2005b), muestra la modificación del patrón de toxicidad en función del empleo o no de abono, y el requerimiento de nuevas investigaciones sobre plantas, ya que probablemente los efectos subletales que presentan pueden ser debidos a fenómenos de disponibilidad de nutrientes y no a la toxicidad directa de la oxitetraciclina.

1.3. Oxitetraciclina

1.3.1. Aspectos generales

Las tetraciclinas forman una de las familias antibacterianas más antiguas; son un grupo de antibióticos de amplio espectro de acción, y tiene una función terapéutica primordial tanto en medicina humana como en veterinaria. Es una familia de antibacterianos formada por distintos compuestos de eficacia relativamente similar, aunque se diferencian principalmente en su comportamiento farmacocinético. La estructura química de estos antibióticos es tetracíclica, de ahí su denominación, siendo su núcleo central el octahidronaftaceno (**Figura 3**).

Las tetraciclinas son compuestos que fueron descubiertos en la década de los años 40 por Benjamin M. Duggar que con el fin de hallar un compuesto seguro para el tratamiento de la tuberculosis, analizó una gran variedad de muestras de suelos procedentes de todo el mundo, en las que aisló una especie de actinomiceto dorado y lo identificó como *Streptomyces*

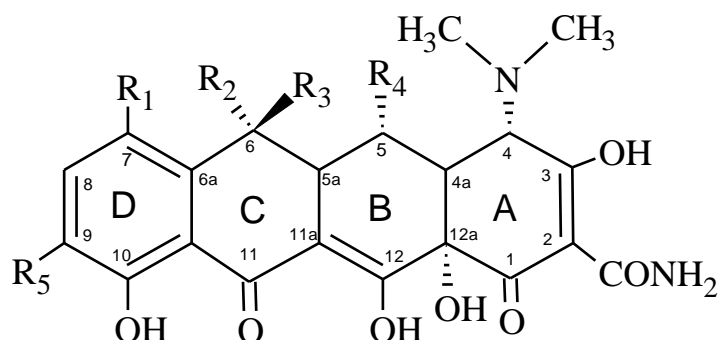
aureofaciens, productor de una sustancia cristalina, la aureomicina o clortetraciclina con propiedades antimicrobianas y amplio espectro de actividad. Así la clortetraciclina fue la primera de ellas, la oxitetraciclina fue la siguiente tetraciclina en ser descubierta, en 1950, producto del *Streptomyces rimosus*. Más adelante se fueron descubriendo las demás moléculas de esta clase de antoticos como la tetraciclina en el año 1953, demeclociclina, o demetilclortetraciclina en el año 1957, rolitetraciclina en el año 1958 y limeciclina en el año 1961 (Chopra y Roberts, 2001; Baeyens y del Pozo, 2008). La clortetraciclina y la oxitetraciclina son antibióticos obtenidos de forma natural y que solamente pueden obtenerse por fermentación; en cambio, la tetraciclina y demetilclortetraciclina se pueden conseguir por fermentación o semisíntesis. Las moléculas descritas anteriormente pertenecientes al grupo de las denominadas tetraciclinas de primera generación, se caracterizan por tener una absorción reducida y una baja solubilidad de grasa y todas ellas pueden ser administradas oralmente excepto la rolitetraciclina (Agwuh y MacGowan, 2006). La metaciclina fue sintetizada en el año 1961, la doxiciclina en el año 1966 y la minociclina en el año 1967, formando el grupo de tetraciclinas de segunda generación; algunas de ellas obtenidas por semisíntesis se desarrollaron para aumentar la solubilidad y la correspondiente absorción y para prolongar la semivida biológica de la molécula en el organismo. Están disponibles tanto en fórmulas orales como intravenosas. Se han desarrollado técnicas de regeneración protoplasmática en los cultivos de *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces aureofaciens* con el fin de mejorar las condiciones de producción de los antibióticos tetraciclinas tales como la oxitetraciclina y la clortetraciclina (Isaeva y Voeikova, 1990). Una nueva subfamilia, las tetraciclinas de tercera generación, está constituida por las glicilciclinas especialmente desarrolladas con el fin de resolver los problemas de resistencias y cuyo producto mayoritariamente utilizado es la tigeciclina, de potente actividad antibacteriana y amplio espectro de acción (Chopra y Roberts, 2001; Mediavilla *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2009) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tetraciclinas de primera, segunda y tercera generación

| GENERACIÓN | NOMBRE GENÉRICO | |
|-------------------------------|-------------------------|--|
| Primera (1948-1963) | Clortetraciclina | Producidas por dos diferentes especies de <i>Streptomyces</i>; descubiertas entre 1948 y 1950 |
| | Oxitetraciclina | |
| | Tetraciclina | |
| | Demeclociclina | Obtenidas a partir de <i>Streptomyces</i> en la década de 1950 |
| | Rolitetraciclina | |
| | Limeciclina | Derivados semisintéticos caracterizados por su hidrosolubilidad |
| | Clomociclina | |
| Segunda (1965-1972) | Metaciclina | Derivados semisintéticos de las primeras |
| | Doxiciclina | |
| | Minociclina | |
| Tercera (1993-) | Glicilciclinas | El grupo más recientemente descrito; tigeciclina es el máximo representante |

Las tetraciclinas en general tienen actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, y otros organismos como *Mycoplasma*, *Chlamydia* y *Rickettsia* y parásitos protozoarios colectivamente. Son antibióticos bacteriostáticos cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de las proteínas bacterianas por fijarse a la subunidad ribosómica 30s, bloquean la fijación del aminoacil ARNt al sitio receptor del complejo ARNm-ribosoma y en consecuencia, la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Mediavilla *et al.*, 2008).

Las tetraciclinas tienen en común todas ellas una estructura policíclica, naftacenocarboxamida, derivado de un octahidronaftaceno con varios centros estereogénicos y cuya estereoquímica resulta fundamental para su actividad biológica.



| Tetraciclinas | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------|----------------|--|
| Tetraciclina | H | CH ₃ | OH | H | H |
| Clortetraciclina | Cl | CH ₃ | OH | H | H |
| Oxitetraciclina | H | CH ₃ | OH | OH | H |
| Doxiciclina | H | CH ₃ | H | OH | H |
| Metaciclina | H | = CH ₂ | H | OH | H |
| Minociclina | N(CH ₃) ₂ | CH ₃ | OH | H | H |
| Demeclociclina | Cl | H | OH | H | H |
| Tigeciclina | N(CH ₃) ₂ | H | H | H | NH(CO)NHC(CH ₃) ₃ |

Figura 3. Estructura general de las tetraciclinas

Las tetraciclinas son sustancias con una estructura química compleja que pueden reaccionar de múltiples formas y cuya polifuncionalidad puede ser explicada en términos de su origen biosintético. La molécula representativa que da origen al nombre es la tetraciclina (**Figura 1**). Posee un gran número de grupos funcionales que hacen posible su descomposición y disolución en agua. Los grupos funcionales existentes son los siguientes:

- función amida en el átomo de carbono en posición 2,
- grupo –OH en el átomo de carbono en posición 10,
- grupo –OH en los átomos de carbono en posición 3 y 12,

- grupo –OH terciario en los átomos de carbono en posición 6 y 12a,
- α y β grupos insaturados en la secuencia atómica 1, 2, 3, 11, 11a y 12,
- grupo amino terciario en el átomo de carbono en posición 4.

Igualmente poseen funciones que son las responsables de la relación espacial de grupos atómicos específicos (Roth *et al.*, 1991).

- un cromóforo (C10-11-11a-12) constituido por un fenol con unión β -dicetona,
- un grupo ácido vinílico (C1-2-3) comparado al ácido ascórbico,
- una estructura vinílica ácido carbámico (C2-C3),
- un grupo α -amino cetona vinílico (C1-2-3-4) con un grupo dimetilamino fácilmente dissociable,
- un grupo α -cetol,
- pero con una función carbinol terciaria la cual inhibe la enolización (C1-12a),
- una función α -glicol (C12-12a),
- una función α -aminoalcohol.

Las modificaciones sintéticas realizadas sobre los grupos funcionales de oxígeno presentes en la parte inferior de la molécula implican una pérdida de actividad biológica. Sin embargo, las modificaciones sintéticas realizadas a lo largo de la región superior de la molécula dan lugar a nuevos compuestos con una mayor actividad biológica, en algunos casos con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes a otras tetraciclinas. Además, la alteración de los grupos funcionales en esta región puede inducir cambios en tamaño, forma, carga, densidad electrónica y polaridad. Dichas modificaciones estructurales conducen a cambios en la solubilidad, lipofilia e incluso en la afinidad con sus moléculas diana. Sin embargo las tetraciclinas con actividad antibacteriana, en general, sólo difieren entre ellas por sus características farmacocinéticas.

1.3.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas

La fórmula estructural de la oxitetraciclina corresponde a la (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12,12a-octahidronaftaceno-2-carboxamida.

La oxitetraciclina se comporta como una molécula anfótera que existe en solución neutra fundamentalmente como ion híbrido aunque posee tres constantes de disociación relacionadas con los grupos funcionales indicados en las **Figuras 4 y 5**. El color amarillo de los cristales

de oxitetraciclina está basado en el anillo cromóforo BCD. El anillo A contiene otro cromóforo el cual absorbe aproximadamente a 260 nm. La sensibilidad a la luz que presenta la oxitetraciclina es debida a ambos.

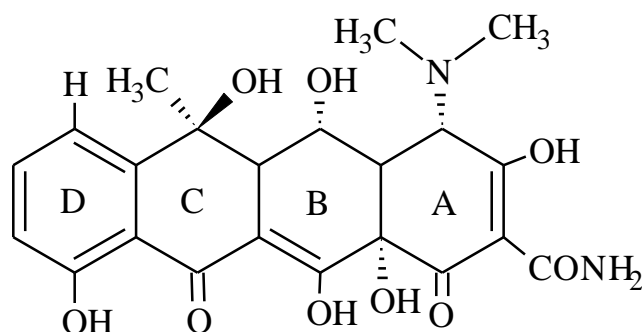
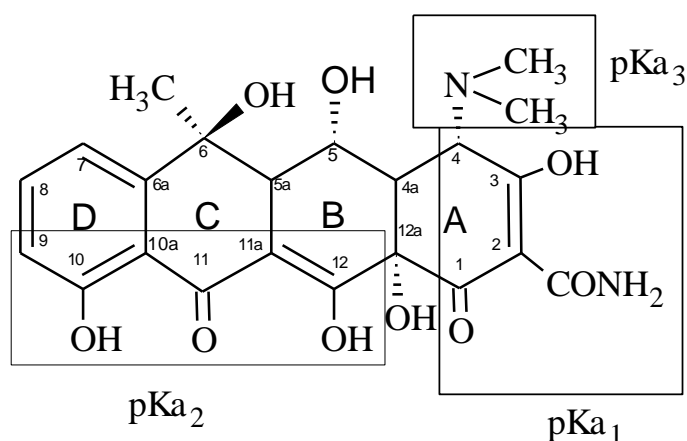


Figura 4. Estructura química de la oxitetraciclina (Prescott y Baggot, 1991).



| | pKa ₁ | pKa ₂ | pKa ₃ |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Oxitetraciclina | 3,3 | 7,3 | 9,1 |

Figura 5. Constantes de disociación características de la oxitetraciclina

La oxitetraciclina, como todas las tetraciclinas, presenta fácil descomposición y disolución en agua debido al gran número de grupos funcionales. La reacción ácida de las soluciones acuosas de la oxitetraciclina es debida a la fácil disociación del ácido trivalente. En las **Figuras 6, 7, 8 y 9** se muestra la reacción ácida de la oxitetraciclina (también sucede en

cualquier tetraciclina) en solución acuosa debido a sus diferentes pK_a en las distintas posiciones de la molécula en función de sus grupos funcionales.

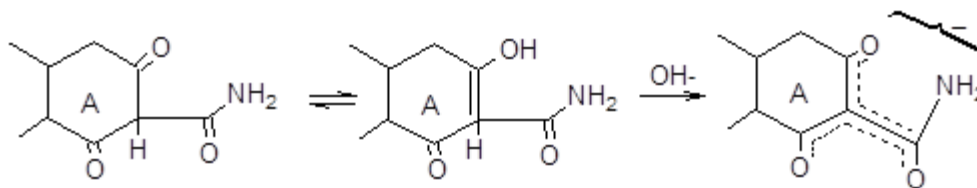


Figura 6. Enolización del grupo tricarbónico en el anillo A: $pK_{a1}=3,3$

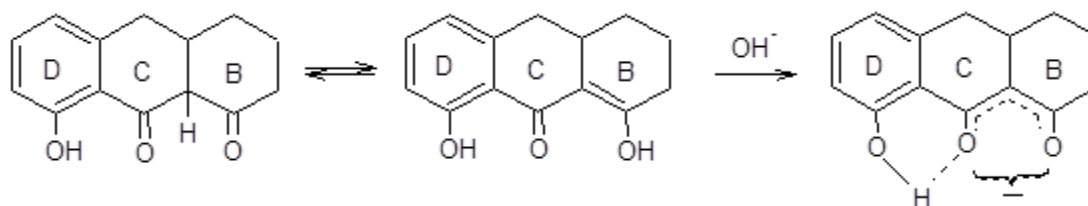


Figura 7. Enolización del sistema β -carbonílico en los anillos B y C: $pK_{a2}=7,7$

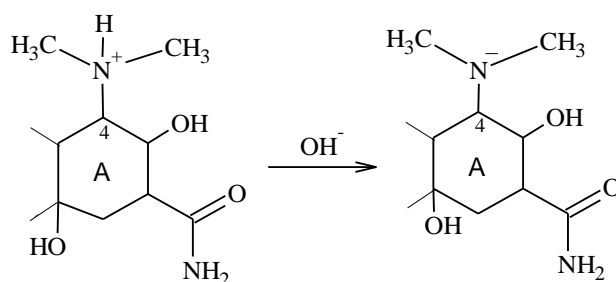


Figura 8. El grupo dimetil amino en posición 4 funciona como un ácido catiónico $pK_{a3}=9,1$.

La oxitetraciclina en medio ácido, al tener un grupo -OH en el carbono en posición 6 elimina agua fácilmente, sobre todo a alta temperatura (**Figura 9**). En el caso de un medio ácido fuerte, se produce anhidro-oxitetraciclina por una reacción de deshidratación entre dicho hidroxilo y el hidrógeno en el carbono en posición 5a. Se genera así un doble enlace que induce la aromatización posterior del anillo C a través de un proceso de tautomería.

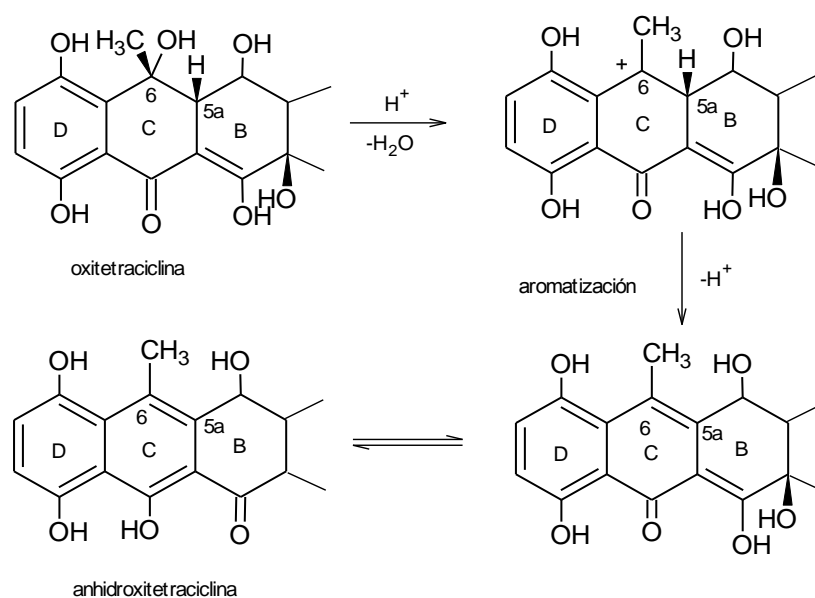


Figura 9. Reacción en medio ácido de oxitetraciclina y formación de anhidro-oxitetraciclina.

Este derivado anhidro es inestable y vira en medio ácido hidroxílico a α -apoxitetraciclina y β -apoxitetraciclina (**Figura 10**).

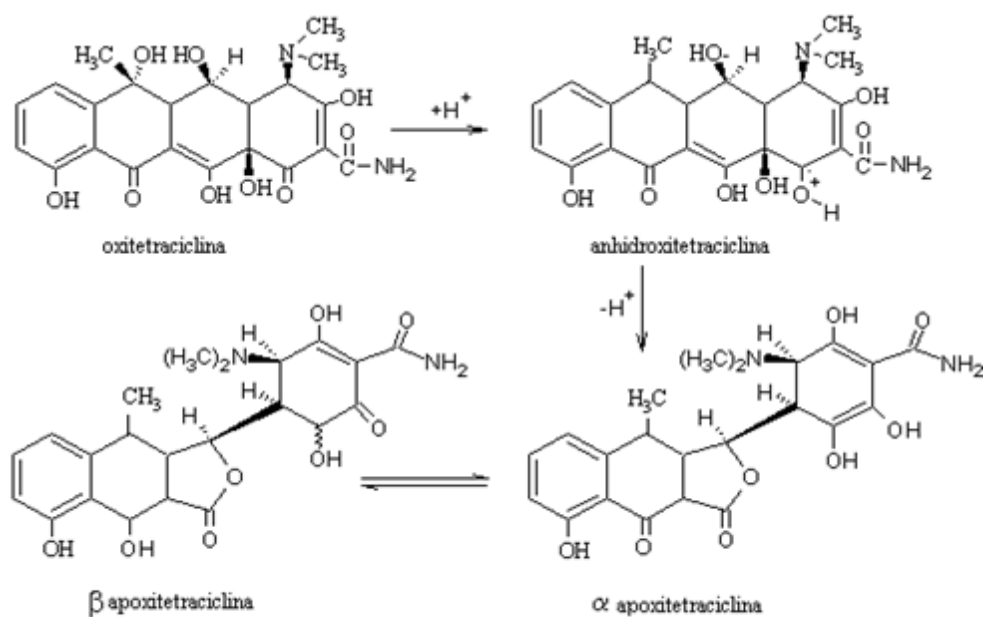


Figura 10. Reacción de la oxitetraciclina en medio ácido y formación de epímeros.

Las tetraciclinas en medio básico producen isotetraciclinas inactivas, de esta forma, la oxitetraciclina en medio básico produce isoxitetraciclina, por reacción del hidroxilo en el carbono en posición 6 y la cetona en el carbono en posición 11, en una reacción retro-Claisen, previa tautomería del enol en el carbono en posición 12 a un compuesto decarboxílico. Se rompe así el enlace entre los carbonos en posición 11, 11a y se forma el anillo de lactona con apertura del anillo C (**Figura 11**).

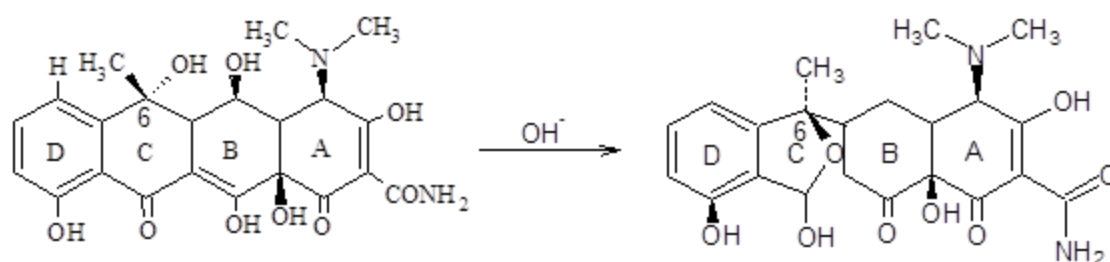


Figura 11. Reacción de oxitetraciclina en medio básico fuerte y formación de isoxitetraciclina.

Otro compuesto relacionado es la 2-acetil-2-decarboxamidoxitetraciclina. Esta sustancia es una impureza de fermentación que es prácticamente inactiva a nivel terapéutico. La tetraciclina es también descrita como impureza de la fermentación de la oxitetraciclina (Khan *et al.*, 1996).

El mayor problema que se da a la hora de estudiar los productos de degradación de la oxitetraciclina como la epi-, anhidro- o epi-anhidro-oxitetraciclina que están presentes en una cantidad variable en la sustancia pura y en el producto terminado, es valorar también sus potenciales propiedades antimicrobianas (**Figura 12**). Estos resultados no son necesariamente una representación cierta de la potencia antimicrobiana del producto terminado. La actividad antimicrobiana está basada principalmente en la molécula de oxitetraciclina, no en sus posibles epímeros. Bajo condiciones anormales (calor, pH, humedad) la oxitetraciclina se epimeriza en el carbono 4 de forma reversible en una mezcla de epi-, anhidro-, epianhidro- y oxitetraciclina.

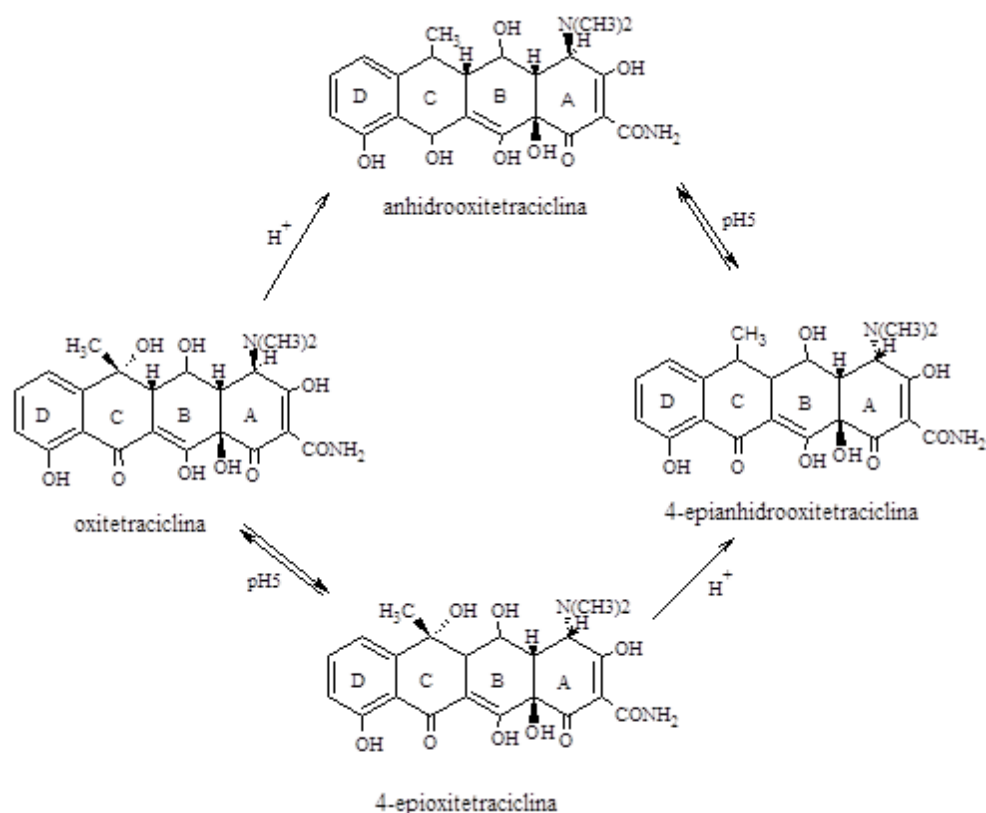


Figura 12. Epimerización de la oxitetraciclina a pH entre 3 y 5.

A valores de pH intermedios, se epimeriza en el carbono en posición 4 a epioxitetraciclina a través de la función dimetilamino que interacciona con el $-OH$ del carbono en posición 12a. En medio acuoso esto ocurre rápidamente a pH 3-5 dando lugar a una mezcla en la que los dos epímeros se encuentran en igual proporción, sin embargo la proporción en estado de equilibrio entre la oxitetraciclina en estado natural y sus epímeros es de 2/3 y 1/3 respectivamente. Las 4-epi-tetraciclinas son poco activas como antibióticos, con una actividad antimicrobiana que oscila entre el 2 y el 5% con respecto a la tetraciclina madre (Mitscher *et al.*, 1972).

La oxitetraciclina, como todas las tetraciclinas, a pH fisiológico posee conformaciones idénticas con un enlace de hidrógeno entre el grupo 12a-hidroxi y el grupo 4-dimetilamino, dando lugar a un aplanamiento del anillo A (**Figura 13**). Aunque esta conformación es la que corresponde a pH fisiológico puede no ser activa (Mitscher *et al.*, 1972). Las tetraciclinas se encuentran ionizadas a pH fisiológico, existiendo en formas catiónicas a pH más ácidos, en formas alcalinas a pH más básicos y en la forma zwitteriónica a pH relativamente neutros. Los coeficientes aparentes de partición (determinantes de la liposolubilidad de las formas no ionizadas) en solución octanol/agua a pH comprendidos entre 2,1 y 8,5 han sido

determinados por diversos autores (Colaizzi y Klink, 1969) para varias tetraciclinas. Utilizando las constantes de disociación se calcularon las cantidades de cada forma iónica de tetraciclina presente en los diferentes valores de pH. La forma zwitterónica constituida por el sistema tricarbonilmetano ionizado, dicetona fenol no ionizado y dimetilamino ionizado se encontraba presente en mayor concentración en un rango de pH de 4 a 7 y parece ser que es la forma que presenta mayor liposolubilidad, reduciendo así la polaridad que hace que se presente en formas moleculares con pares iónicos intramoleculares.

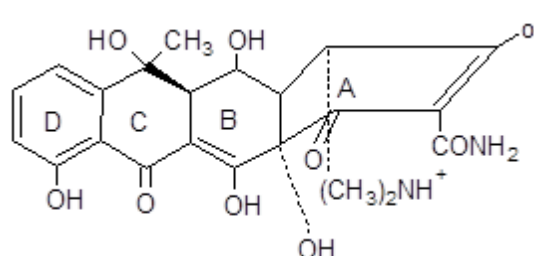


Figura 13. Conformación de la oxitetraciclina a pH fisiológico. El grupo dimetilamino, está bajo el plano del sistema BCD con la posibilidad de un enlace de hidrógeno entre este grupo dimetilamino y el 12a-hidroxi (Mitscher *et al.*, 1972).

La oxitetraciclina es un polvo cristalino amarillo, sin olor y con sabor amargo. Su punto de fusión es 180 °C, temperatura por encima de la cual se descompone. Su solubilidad en agua es de 100 g/l a 20 °C, y se disuelve en soluciones ácidas y básicas. Su exposición a la luz solar o a temperaturas superiores a 90 °C con humedad provoca su oscurecimiento.

Las tetraciclinas son agentes quelantes fuertes y esta característica influye tanto a nivel antimicrobiano como farmacocinético (Chopra y Roberts, 2001). Los sitios de quelación incluyen los grupos β -dicetonas (posición 11 y 12), los grupos enol (posición 1 y 3) y carboxamida (posición 2), y los grupos del anillo A. Las glicilciclinas o tetraciclinas de tercera generación son capaces de formar complejos con cationes divalentes (Someya *et al.*, 1995). Las tetraciclinas pueden formar quelatos con cationes metálicos di- y trivalentes. Estos quelatos son inactivos y no se absorben en el tracto gastrointestinal y su formación depende de la forma y carga de los cationes (Kurt y Stezowski, 1976). A pH entre 3 y 7,5 se ligan al sistema fenólico β -dicarbonílico cationes polivalentes y a pH más elevados más de un catión metálico puede ser ligado con desprotonización del grupo $-OH$ de la posición 12a. La mayoría de los quelatos metálicos que se forman con las tetraciclinas presentan mayor fluorescencia del grupo $-OH$ de la posición 12a y también presentan mayor fluorescencia que

las tetraciclinas solas y por esta razón pueden determinarse a nivel analítico. La oxitetraciclina, por ejemplo, forma quelatos amarillos con iones zirconio y estos emiten a una longitud de onda de 420 nm. En soluciones fuertemente ácidas se producen quelatos en proporción 1:2 con cambios a complejos anhidro en proporción 1:1 (**Figura 14**).

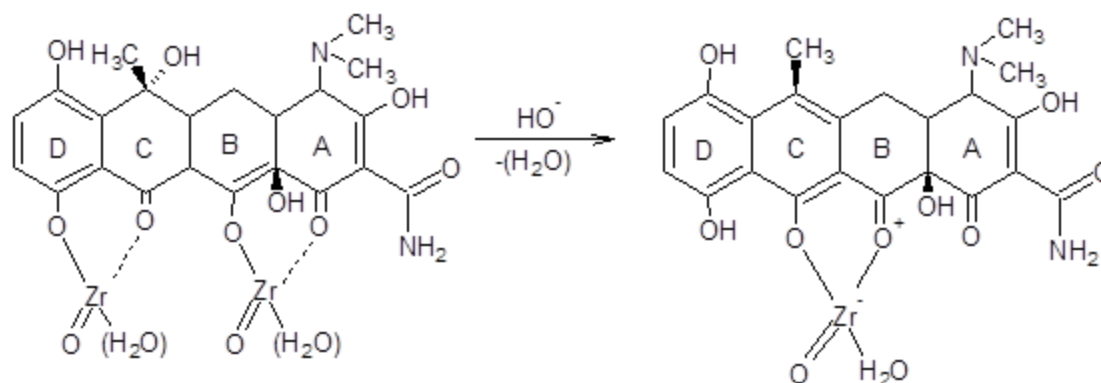


Figura 14. Complejos del antibiótico oxitetraciclina con iones zirconio después de la formación de anhidro-oxitetraciclina.

Kurt y Stezowski (1976) han estudiado el comportamiento de las tetraciclinas en presencia y ausencia de agentes metálicos a una longitud de onda de absorción de 365 nm. Esta absorción parece estar relacionada con el grupo cromóforo BCD de las tetraciclinas y derivados. En presencia de metales alcalinotérreos y cationes divalentes se produce un cambio en la longitud de onda máxima de absorción (Conover, 1953). En general se ha demostrado por estudios cristalográficos que los grupos funcionales con oxígeno de los carbonos 10, 11 y 12 están implicados en la quelación. Además, la quelación posee una conformación espacial específica que suele mantenerse en los derivados de las tetraciclinas influyendo en la interacción con los fluidos biológicos tal y como se ha estudiado determinando las constantes de estabilidad de estos compuestos (Lambs *et al.*, 1988).

La anhidro-oxitetraciclina, uno de los mayores productos de degradación también posee sitios de unión a metales como el Ni^{2+} , tal y como se ha demostrado por métodos espectrofotométricos, siendo los oxígenos en los carbonos de las posiciones 11 y 12 los puntos de coordinación, no estando implicados en la quelación ningún ligando del anillo A (de Siqueira *et al.*, 1994).

La oxitetraciclina también forma complejos solubles en solución acuosa con un gran número de compuestos que contienen centros fuertemente electronegativos tales como citratos, fosfatos o salicilato. Igualmente ocurre con sustancias neutras como cafeína, urea, tiourea y polivinilpirrolidona. La solubilidad de estos complejos en orden de mayor a menor

es la siguiente: salicilato sódico, parahidroxibenzoato sódico, sacarina sódica, paraminobenzoato sódico, cafeína y N-metilpirrolidona. El incremento en la solubilidad está relacionado con el incremento en la formación de estos complejos. La solubilidad puede ser debida a la presencia de centros electronegativos dentro de los agentes usados. Estas variaciones de la solubilidad influyen en el grado de absorción en el tracto gastrointestinal, y son utilizados en formas galénicas (Gans y Higuchi, 1957).

1.3.3 Mecanismo de acción y espectro antibacteriano

Las tetraciclinas poseen un índice terapéutico bastante elevado, definido como el cociente entre los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀) y la dosis eficaz 50 (DE₅₀); la DL₅₀ es la que provoca la muerte en el 50% de los animales de experimentación ensayados y la DE₅₀ es la dosis mínima eficaz capaz de producir la curación en el 50% de los animales de experimentación experimentalmente infectados. Por tanto, cuanto mayor sea el valor de la DL₅₀ y menor el valor de la DE₅₀ más eficacia antimicrobiana tendrá el antibiótico. Las tetraciclinas discriminan entre los ribosomas procariotas y eucariotas, de modo que inhiben la síntesis proteica de patógenos uniéndose al ribosoma de los procariotas. Para que tenga lugar este efecto, las tetraciclinas primeramente deben atravesar las membranas de las bacterias y acumularse en el interior de las mismas para poder ejercer su acción (Chopra *et al.*, 1981; Mediavilla *et al.*, 2008). En bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, la pared celular está constituida por tres regiones distintas, la membrana externa, el espacio periplásmico (entramado de peptidoglicano) y la membrana interna. Las tetraciclinas pueden atravesar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas a través de poros formados por tres tipos de proteínas, Ia, Ib y II, de carácter hidrofílico, lo que permite la difusión de moléculas hidrofílicas en el espacio periplásmico. Las tetraciclinas difunden a través de los poros constituidos por proteínas tipo Ia. Este mecanismo también lo comparten otros antibióticos como los β -lactámicos, que no tienen una estructura similar a las tetraciclinas (Chopra y Howe, 1978).

El pH juega un papel importante en el paso de las tetraciclinas a través de las paredes celulares bacterianas tal y como demuestran diversos autores (Yamaguchi *et al.*, 1991). El paso de las tetraciclinas a través de las membranas celulares se ve incrementado por una disminución del pH e inhibido por un incremento en la concentración de iones Mg^{2+} ; las tetraciclinas difunden en forma protonada y se acumulan en la membrana interna formando complejos no permeables con Mg^{2+} . Existe una disminución de la actividad de las tetraciclinas frente a organismos tales como *E. coli*, *Aerobacter aerógenes* y *Aerobacter*

aureus cuando se incrementa en el medio la concentración de iones Mg^{2+} (Benbough y Morrison, 1967). El complejo formado se disocia en el periplasma y la molécula de tetraciclina con una débil lipofilia es capaz de difundir a través de la bicapa lipídica de la membrana interna hasta llegar al citoplasma; esto representa el primer paso de una penetración celular por transporte activo dependiente de la energía (Chopra, 1988; Livermore, 1990; Chopra y Roberts, 2001). Las tetraciclinas se acumulan en el interior de la bacteria en forma de complejos con metales iónicos divalentes (Franklin y Higginson, 1970).

La falta de actividad inhibitoria selectiva de las tetraciclinas frente a las células de mamíferos es debida a la imposibilidad para acumularse en su interior. Si las células de los mamíferos también poseen un sistema de transporte activo dependiente de Mg^{2+} , estas células también deberían acumular complejos de antibióticos con Mg^{2+} , hecho que no ocurre, por lo tanto, la acumulación de las tetraciclinas por las bacterias parece no depender solo de un transporte activo dependiente de Mg^{2+} .

Se ha propuesto que la acumulación de la oxitetraciclina así como de otras tetraciclinas como la tetraciclina y la clortetraciclina en *E. coli* y *S. aureus* podría realizarse por un sistema de transporte del tipo ácido C4-dicarboxílico por el que el oxalacetato compite con el antibiótico. En *E. coli* este transporte activo es inducible y se produce en presencia de AMPc como cofactor. Parece ser que existen transportadores diferentes según el antibiótico implicado. En células de mamíferos, no esté presente el sistema de transporte de ácido C4-dicarboxílico y esto podría ser la razón por la que las células de los mamíferos no acumularían el antibiótico, aunque dichos antibióticos sí ejercen una débil acción sobre ribosomas 80s de las células eucariotas (Hopf *et al.*, 1988; Chopra y Roberts, 2001).

Una vez en el interior de la célula bacteriana las tetraciclinas ejercen su acción, en primer lugar, inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias, y como consecuencia, se observa también una disminución en la síntesis de ácidos nucleicos y de la pared celular (Gale y Folkes, 1953; Hash *et al.*, 1964) (**Figura 15**).

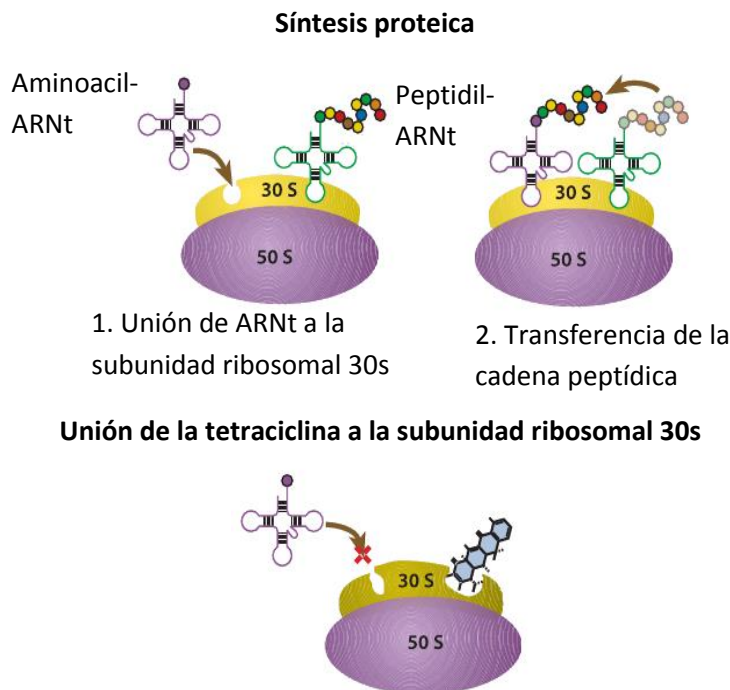


Figura 15. Mecanismo de acción de las tetraciclinas (Castillo *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas inhiben la síntesis proteica por bloqueo de la unión específica del aminoacil-ARNt (sitio P). Esto indica que el antibiótico inhibe la unión al “sitio A” del ribosoma, pero no al “sitio P” del mismo (Sarkar y Thach, 1968). El “sitio A” se encuentra en la porción 30s del ribosoma (Suzuka *et al.*, 1966; Bodley y Zieve, 1969; Janata y Mikulik, 1995). En la **Figura 16** se describe el sistema de síntesis proteica ribosomal así como el lugar de acción de las tetraciclinas.

La interacción de una molécula de tetraciclina con un ribosoma es suficiente para inhibir la síntesis proteica. Los ribosomas tienen una conformación flexible y esta flexibilidad es importante para realizar su función (Tritton, 1977). Es importante indicar, que a altas concentraciones de Mg^{2+} , la síntesis de fenilalanina es inhibida aún en ausencia de tetraciclinas produciéndose una sobreestabilización de la estructura ribosomal inhibiéndose de esta forma la conformación flexible requerida para la síntesis de fenilalanina. Los quelatos de Mg^{2+} con tetraciclinas muestran mayor fluorescencia que las tetraciclinas por sí mismas y esta fluorescencia aumenta en la unión a los ribosomas de *E. coli*. Esta fluorescencia parece que se atribuye a la unión de los ribosomas vía quelación con magnesio. Existe evidencia de que se forma un puente quelato Mg^{2+} por la acción de las tetraciclinas aunque esta teoría ha sido cuestionada por algunos autores (Last, 1969).

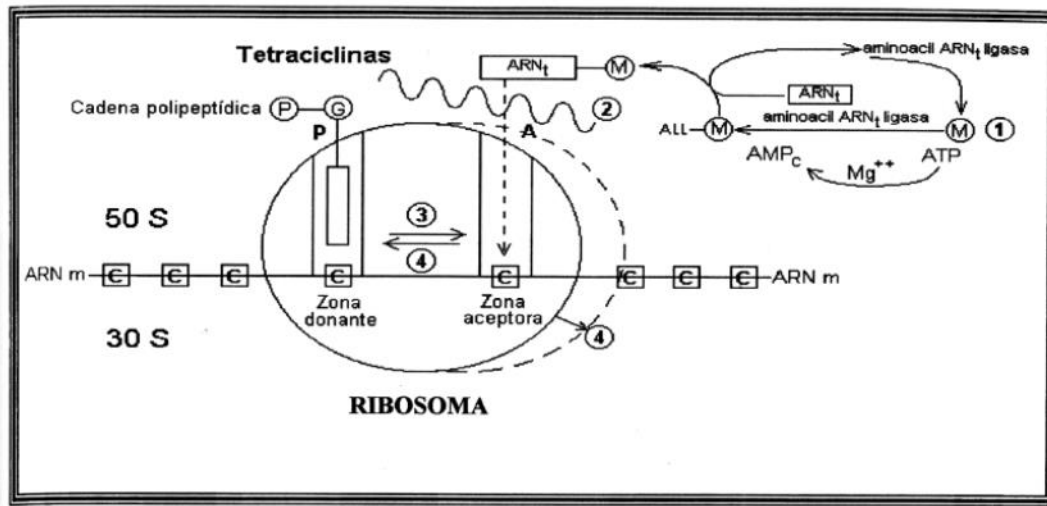


Figura 16. Síntesis proteica bacteriana y mecanismo de acción de las tetraciclinas.

- Los codones C del ARNm se sitúan en primer lugar sobre el “sitio A”, emparejándose con el aminoacil-ARNt. Éste previamente se ha formado de la unión del aminoácido con una molécula de ATP en presencia de Mg^{2+} y por medio de la enzima aminoacil-ARNt-ligasa, enzima que cataliza la unión del aminoácido con el ARNt específico formando así el correspondiente ARNt activado.
- El ARNt activado queda anclado en el “sitio A” aceptor. En el “sitio P”, existe una cadena peptídica en formación unida al ARNt del anterior aminoácido.
- Transpeptidación o transferencia de la cadena peptídica ya sintetizada del sitio donante al aceptor, liberándose el ARNt del “sitio P” y fijándose un nuevo aminoácido.
- Traslocación o transferencia de la cadena alargada de un peptidil ARN de transferencia al “sitio P” donante. Al mismo tiempo el ARNm se desplaza un codón para vincularse a un nuevo ARNt.

Las tetraciclinas compiten por el sitio aceptor en la zona 30s del ribosoma con el aminoacil-ARNt, y probablemente también en la activación del complejo ARNt por formación de complejos con Mg^{2+} .

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro y su acción sobre los microorganismos es principalmente bacteriostática y tiempo-dependiente. Tienen una actividad considerable frente a muchas bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, espiroquetas, mycoplasmas, clamidias y rickettsias, así como frente a algunos géneros de

protozoos. En las **Tablas 2 y 3** se indica la actividad *in vitro* antimicrobiana de la oxitetraciclina frente a diversos microorganismos aislados en medicina humana y frente a diversos microorganismos aislados de varias especies animales, respectivamente.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana in vitro de la oxitetraciclina frente a microorganismos aislados en medicina humana

| MICROORGANISMO | OXITETRACICLINA (OTC) | | Referencia |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------------|
| | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | |
| | µg/ml | µg/ml | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,6->100 | 6,3 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,4->100 | >100 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Diplococcus pneumoniae</i> | 0,09-1,6 | 0,19 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,2-0,8 | 0,4 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 0,19-50 | 0,78 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,4-6,3 | 1,6 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Streptococcus viridans</i> | 3,9-100 | 1,6 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,8-12,5 | 1,6 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Enterococcus</i> | 6,3-100 | 100 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,8->100 | 50 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 0,78-6,3 | 1,6 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,05-1,6 | 0,4 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 0,4-1,6 | 0,8 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 50->100 | 100 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 50->100 | 100 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |

| MICROORGANISMO | OXITETRACICLINA (OTC) | | Referencia |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------------|
| | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | |
| | µg/ml | µg/ml | |
| | | | |
| <i>Aerobacter</i> | 3,1->100 | 12,5 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Hemophilus influenzae</i> | 3,1-12,5 | 12,5 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,8-6,3 | 3,1 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Escherichia coli</i> | 1,6->500 | 12,5 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 1,6->100 | 6,3 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 100->100 | >100 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 3,1->100 | >100 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 12->100 | 100 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| | 0,8-25 | 3,1 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 6,3-25 | 25 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 50->500 | >500 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| <i>Salmonella</i> | 3,1-100 | 6,3 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Shigella</i> | 1,6->100 | 1,6 | HIRSCH y FINLAND, 1960 |
| <i>Serratia</i> | 200-300 | 300 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| <i>Providencia</i> | 100->500 | >100 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,39-1,6 | 0,78 | STEIGBIGEL <i>et al.</i> , 1968 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 0,01-0,25 | | BIANCHI <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Campylobacter fetus fetus</i> | - | ≤2 | KWON <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | - | ≥32 | RYLANDER y HALLANDER, 1988 |

Tabla 3. Actividad antimicrobiana *in vitro* de la oxitetraciclina frente a bacterias de interés en clínica veterinaria

| MICROORGANISMO | ESPECIE ANIMAL | OTC | | Referencia |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| | | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | |
| | | µg/ml | µg/ml | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Varias especies | 0,3 | >64 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Streptococcus uberis</i> | Varias especies | 0,5 | 0,5 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | Varias especies | 4 | >32 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Streptococcus suis</i> | Porcino | 0,06 | 0,25 | PIJPERS <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | Varias especies | 0,25 | >32 | SENGELØV <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i> | Peces | 10,95 | 10,95 | BANDIN <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Aves | 12,5 | >25 | KAMIYA <i>et al.</i> , 1987 |
| | Varias especies | 0,1 | 6 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| | Bovino | 16 | 16 | SASAKI <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Clostridium septicum</i> | Bovino | 0,063 | 8 | SASAKI <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Clostridium sordelii</i> | Bovino | 16 | 32 | SASAKI <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Erysipelothrix insidiosa</i> | Porcino | >1,723 | - | KINJO y MACHIDA, 1973 |

| MICROORGANISMO | ESPECIE ANIMAL | OTC | | Referencia |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| | | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | |
| | | µg/ml | µg/ml | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Varias especies | 0,25 | 1 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | Porcino | 0,25 | 1 | PIJPERS et al., 1989 |
| | Varias | - | 1,6 | PRESCOTT y BAGGOT, MATEU DE ANTONIO y MARTIN, 1995 |
| <i>Brucella canis</i> | Perros | 0,06 | 5 | MARTIN, 1995 |
| | Perros | 0,09 | 0,19 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Brucella mellitensis</i> | Varias especies | 0,06 | 5 | MATEU DE ANTONIO y MARTIN, 1995 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Varias especies | >16 | <16 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Peces | 5 | - | INGLIS y RICHARDS, 1991 |
| | Peces | 8 | 16 | BRUUN <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Dermatophilus congolensis</i> | Bovino | 12,5 | 25 | EWGU, 1992 |
| <i>Nocardia asteroides</i> | Varias especies | 32 | 32 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Bacteroides nodosus</i> | Varias especies | - | 12 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | Varias especies | 12,5 | 25 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |

| MICROORGANISMO | ESPECIE ANIMAL | OTC | | Referencia | | |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|---|---------|
| | | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | | | |
| | | µg/ml | µg/ml | | | |
| <i>Leptospira sp.</i> | Varias especies | - | 1 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Treponema hyodysenteriae</i> | Varias especies | 0,4 | 50 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Haemophilus equigenitalis</i> | Varias especies | <0,2 | 0,4 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Haemophilus somnus</i> | Varias especies | - | 1,6 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Haemophilus pleuropneumoniae</i> | Varias especies | 0,8 | 1,6 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Proteus sp.</i> | Varias especies | - | >16 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Salmonella</i> | Varias especies | 64 | 256 | ESAKI et al., 2004 | | |
| <i>Pasteurella multocida</i> | Porcino | 0,3 | 1 | INAMOTO et al., 1994 | | |
| | Bovino | 0,78 | 3,13 | YOSHIMURA et al., 2001 | | |
| | Porcino | 1,56 | 12,5 | YOSHIMURA et al., 2001 | | |
| <i>Pasteurella haemolytica</i> | Bovino | 0,61 | 1 | HARTMAN y GERYL, 1993 | | |
| <i>Salmonella tiphymurium</i> | Varias especies | >16 | >16 | PRESCOTT 1991 | y | BAGGOT, |
| <i>Escherichia coli</i> | Ovino, Bovino, | | | | | |

| MICROORGANISMO | ESPECIE ANIMAL | OTC | | Referencia |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| | | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | |
| | | µg/ml | µg/ml | |
| | Equino | - | >5 | MAHIPAL et al., 1992 |
| | Varias | 1 | >32 | SENGELØV et al., 2003 |
| | especies | 2,5 | 80 | INGLIS y RICHARDS, 1991 |
| | Peces | | | |
| <i>Campylobacter jejuni, coli</i> | Varias especies | - | 0,2-0,5 | PRESCOTT y BAGGOT, 1991 |
| <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | Aves | 0,05 | 200 | BURCH y VALKS, 2002 |
| <i>Mycoplasma conjunctivae</i> | Ovino | 0,78 | 62 | EWGU, 1992 |
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | Porcino | 0,04 | 2,5 | YAMAMOTO et al., 1986 |
| <i>Mycoplasma dispar, Bovigenitalicum, synoviae</i> | Porcino | 0,08 | >16 | COOPER et al., 1993 |

1.3.4. Resistencias

La diseminación de patógenos resistentes a las tetraciclinas es una de las principales amenazas al éxito del tratamiento de enfermedades microbianas. Debe señalarse desde el principio que dos bacterias pueden emplear diferentes tipos de resistencias para soportar el mismo agente antimicrobiano. Los mutantes resistentes surgen de forma espontánea y después son seleccionados. El conocimiento del origen de las resistencias bacterianas a las tetraciclinas se ha venido estudiando a través de estudios genéticos y moleculares en bacterias. Existen muchos genes de resistencia a las tetraciclinas y un gran número de ellos se

asocia a los elementos móviles en forma de plásmidos y transposones. Los determinantes genéticos implicados en la resistencia a tetraciclinas son los genes *tet* y *tor* (Chopra y Roberts, 2001).

Así, tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, el origen de la resistencia a tetraciclinas parece ser cromosómico o extra-cromosómico con predominio de éste último. En microorganismos Gram-negativos, la resistencia a tetraciclinas es debida a la presencia de plásmidos-R y es una resistencia inducida dado que se obtienen niveles máximos de resistencias cuando los microorganismos sensibles están expuestos a concentraciones por debajo de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de las tetraciclinas (Chopra y Howe, 1978; Levy y McMurry, 1978; Chopra y Roberts, 2001).

En estafilococos, existen dos modelos fenotípicos de resistencia a las tetraciclinas. Uno de ellos es inducido, por la presencia del antibiótico tetraciclina pero no por minociclina y es mediado por plásmidos de resistencia transmisibles por transducción (mediante bacteriófagos). El otro modelo es una resistencia constitutiva a ambos, minociclina y tetraciclina y se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano (Chopra *et al.*, 1974; Asheshov, 1975).

Los genes responsables de la resistencia en microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos como es el caso de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas se encuentran en transposones denominados Tn10, los cuales pueden formar parte de un plásmido-R, integrarse dentro del genoma cromosómico y pasar desde el plásmido de una célula bacteriana a otra. Esto nos indica la gran cantidad de variaciones genéticas que codifican la resistencia a tetraciclinas. La resistencia a los antibióticos tetraciclinas suele ser lenta, progresiva y por eslabones múltiples; es común para todas ellas, es decir, se considera que poseen una resistencia cruzada para todas las tetraciclinas, y múltiple con otros antibióticos, fundamentalmente frente a microorganismos capaces de adquirir genes de resistencia (Izaki y Arima, 1963).

Los plásmidos-R se encuentran libres en el citoplasma y se componen del factor de transferencia (FT) que controla la multiplicación espontánea de los mismos y la transmisión a otros gérmenes (por conjugación) y de otra parte constituida por los determinantes de la resistencia (RF); su número de 6 a 8 por plásmido y su combinación, puede ser muy variado. El paso de los plásmidos-R de resistencia de una bacteria a otra, se realiza por conjugación de la bacteria donante y la bacteria receptora.

En cuanto a los determinantes que controlan la resistencia a tetraciclinas han sido detectados al menos una docena y son capaces de controlar los siguientes mecanismos:

- Expulsión activa de las tetraciclinas del interior de la bacteria (Clases *tet* A-E), clases encontradas en bacterias entéricas; las clases K y L encontradas entre microorganismos Gram-positivos y clase P en *Clostridium*. (Ménde *et al.*, 1980; Levy, 1989; Speer *et al.*, 1992).
- Protectores de la estructura ribosomal (Clases M-O-Q) entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Nelson *et al.*, 1994).

No obstante, existen otros determinantes que inhiben estos mecanismos, es decir algunas cepas resistentes a tetraciclinas pueden devolver su sensibilidad si se encuentran en un medio libre de tetraciclinas (Chopra *et al.*, 1974; Chopra y Roberts, 2001). Se han realizado diversas modificaciones en la estructura química de las tetraciclinas para comprobar la activación de estos determinantes ante la presencia de tetraciclinas no reconocidas por los determinantes que codifican la expulsión de las tetraciclinas a partir del interior celular (Nelson *et al.*, 1993, 1994; Rothstein *et al.*, 1993).

La expresión de los determinantes de las tetraciclinas induce a la formación de proteínas de diferentes pesos moleculares en la membrana interna de las bacterias resistentes las cuales intervienen en un mecanismo de transporte activo para eflujo de las tetraciclinas del interior de las células bacterianas resistentes y así se produce la supervivencia celular (Ball *et al.*, 1980). Además existe un cambio en la composición de la membrana de las células bacterianas resistentes que impide la penetración de las tetraciclinas a través de los poros de la membrana al interior celular.

Los determinantes protectores de los ribosomas inducen la formación de proteínas que impiden el acceso de las tetraciclinas a la estructura ribosomal para ejercer su acción.

En estreptococos, los distintos determinantes han sido caracterizados con pruebas de ADN. El determinante *tet L* es mediado por plásmidos y realiza el eflujo fuera de la célula de las tetraciclinas. Los determinantes *tet M* y *tet N* presentan una resistencia expresada por un proteína citoplasmática que interfiere en la interacción de las tetraciclinas con los ribosomas (Burdett, 1980, 1986; Burdett *et al.*, 1982). La localización frecuente del determinante *tet M* en transposones de conjugación hace que exista una gran distribución de este determinante entre diferentes organismos. La resistencia de *Streptococcus pyogenes* data por primera vez

de 1962 (McCormack *et al.*, 1962) y la resistencia de cepas de *Streptococcus faecalis* y estreptococos del grupo B *Streptococcus galactiae* está muy extendida, informando algunos autores de una resistencia en rango de 70% y 5% respectivamente. En conclusión, parece existir una amplia prevalencia de resistencias a tetraciclinas en la mayoría de estreptococos β hemolíticos y en estreptococos del grupo D (Horodniceanu y Delbos, 1980; Persson y Forsgren, 1986). También se ha descrito la resistencia de pneumococos; se han encontrado que cepas resistentes a una tetraciclina también presentaban resistencia a sus análogos, no obstante los pneumococos parecen presentar resistencia a múltiples antibióticos (Goldstein *et al.*, 1978).

En enterobacterias, en las que se han sido caracterizando distintos determinantes (Clase A-E), la transmisión de resistencias se produce por contacto breve entre distintas especies de microorganismos patógenos y no patógenos de *E. coli* y *Salmonella* aunque también con especies de *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella*. El proceso de transmisión entre células bacterianas donantes y receptoras, es posible dentro de un amplio margen de temperatura (15 a 45°C) y de valores de pH (5,5 a 8). En el tracto gastrointestinal y en heces, reinan las condiciones más favorables. El empleo fraudulento de tetraciclinas en animales como promotores del crecimiento ha originado una presión de selección en beneficio de la resistencia antibiótica, así, los gérmenes coliformes de la flora intestinal resistentes a las tetraciclinas, predominan hasta llegar casi al 100% (Smith y Crabb, 1957; Loken *et al.*, 1971; Smith, 1975; Levy *et al.*, 1976; Ahart *et al.*, 1978; Smith y Lovell, 1981; Marshall *et al.*, 1986).

La resistencia que presentan las cepas de *Salmonella* y *Shigella* a tetraciclinas tiene un gran interés epidemiológico por la gran variedad y frecuencia de determinantes genéticos que poseen. Así en 44 cepas de *Shigella* la frecuencia del determinante *tet A* se encontró en un 60% y la frecuencia del determinante *tet B* en un 5%, no encontrándose el determinante *tet C*. En 50 cepas de *Salmonella* la frecuencia de *tet A*, *tet B* y *tet C* fue del 0,1 al 20% y la presencia en combinación fue del 2% (Voskresenskii *et al.*, 1991).

En cepas aisladas de *Vibrio cholerae*, el biotipo *tor* ha presentado resistencia mediada por plásmidos e inducida por la utilización quimioproláctica de las tetraciclinas. En *Enterococcus faecium* se han encontrado plásmidos transmisibles por conjugación que contenían diferentes determinantes, los cuáles también se encuentran integrados en los cromosomas. Los determinantes presentados son de las clases L, M y O. Estos resultados

confirman la complejidad genética de cepas resistentes de *E. faecium*. (Bentorcha *et al.*, 1991).

Pseudomonas aeruginosa presenta resistencia a todas las tetraciclinas y son portadoras de plásmidos pBS 223 que hacen que la acumulación de tetraciclinas disminuya en las células que los contienen. Los determinantes que contienen son la clase *tet C* (O'Hara y Kono, 1975; Kozlova y Boronin, 1985).

Campylobacter jejuni/coli presenta también cepas resistentes a plásmidos de resistencia con determinantes de la clase *tet M-O* estreptocócicos.

Desde la introducción de las tetraciclinas en el tratamiento de infecciones causadas por *Neisseria gonorrhoeae* se han aislado cepas con un incremento gradual de resistencias. Las mutaciones han incrementado la resistencia de los genes cromosómicos a las tetraciclinas y a otros antibióticos (Sparling *et al.*, 1975; Cannon y Sparling, 1984). Desde 1985, aislados de *N. gonorrhoeae* exhiben niveles altos de resistencia a tetraciclinas; esta particular resistencia se ha adquirido a través de un transposón ligado al determinante *tet M* originalmente encontrado en los estreptococos (Franke y Clewell, 1981; Morse *et al.*, 1986; Lefebvre *et al.*, 1991).

En especies de *Mycoplasma* se han aislado en clínica cepas con un alto grado de resistencia a tetraciclinas. Roberts *et al.* (1986) demuestran que la mayoría de las cepas resistentes a tetraciclinas portaban el determinante de la clase M de estreptococos en diferentes partes de su cromosoma. El mismo determinante se ha encontrado en *Ureaplasma urealyticum*. Estos datos sugieren que el determinante *tet M* estreptocócico se está diseminando entre la flora urogenital (Roberts *et al.*, 1986). Se ha observado en *Mycoplasma hominis*, resistente a tetraciclinas, que la composición de la membrana era diferente a la membrana de las cepas sensibles, detectándose una proteína que no está presente en las células sensibles (Christiansson y Mardh, 1983; Lee *et al.*, 1987).

En el caso del *Bacillus anthracis* con ensayos *in vitro* se ha demostrado la presencia de plásmidos *pBC16* inherente que es el responsable de la resistencia a las tetraciclinas (Pomerantsev *et al.*, 1992).

En resumen, se puede decir que la resistencia a tetraciclinas en células bacterianas es generalmente debida a un eflujo dependiente de la energía de las tetraciclinas o a una protección de los ribosomas bacterianos. Los genes que codifican esta resistencia son adquiridos vía plásmidos transferibles o transposomas. Los determinantes *tet* se han

encontrados en un amplio rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que han reducido la eficacia de la terapia con tetraciclinas (Roberts, 1994).

1.3.5. Indicaciones terapéuticas

Para algunas infecciones bacterianas las tetraciclinas tienen una indicación selectiva, en cambio, en otros casos se consideran antibióticos de segunda elección, debido a la existencia de otros agentes antibacterianos más eficaces y mejor tolerados; en estos casos las tetraciclinas deben prescribirse en aquellas circunstancias en que no puede utilizarse el antibiótico de elección preferente.

En medicina humana, tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina se administran por vía oral en adultos a las dosis de 1-2 g/día, según la gravedad de la infección, en tomas de 250-500 mg cada 6 horas; por vía intravenosa, la dosis es de 250-500 mg cada 12 horas. En niños mayores de 8 años, la dosis es de 25-50 mg/kg/día en 4 tomas; la dosis por vía intravenosa es de 10-20 mg/kg/día en 2 dosis. Las enfermedades frente a las cuales las tetraciclinas se muestran eficaces son (Baeyens y del Pozo, 2008):

1. Brucelosis. Las tetraciclinas son los fármacos de elección, tanto en las formas agudas como en las crónicas. Los tratamientos deben ser largos ya que aquellos demasiado cortos favorecen las recaídas.
2. Cólera. Las tetraciclinas se administran junto con las medidas terapéuticas de rehidratación. Tienen también valor profiláctico para los familiares de los pacientes.
3. Infecciones por *Chlamydia*. Comprenden: uretritis no gonocócica, enfermedad inflamatoria pélvica, epididimitis, linfogranuloma venéreo, psitacosis, tracoma o conjuntivitis de inclusión y queratoconjuntivitis. En la conjuntivitis de inclusión las tetraciclinas se pueden utilizar por vía tópica, pero en adultos es mejor utilizar la vía oral. *Chlamydia trachomatis* a menudo es responsable, sola o asociada a otros microorganismos, de las infecciones por transmisión sexual. En las infecciones uretrales, intracervicales o rectales de adultos producidas por este microorganismo se utiliza preferentemente la doxiciclina. En la enfermedad inflamatoria pélvica aguda (que incluye endometritis, salpingitis, parametritis y peritonitis), *C. trachomatis* puede coexistir con otros gérmenes, como *Neisseria gonorrhoeae*, anaerobios, bacilos Gram-positivos, *Mycoplasma hominis*; por ello el tratamiento exige una asociación de diversos antibióticos; uno de ellos puede ser la doxiciclina.
4. Otras infecciones por transmisión sexual. En el granuloma inguinal por *Calymmatobacterium granulomatis*, la administración de tetraciclinas es eficaz si se

mantiene hasta que la lesión desaparezca. Las infecciones gonocócicas actuales presentan características que obligan a modificar el tratamiento clásico: es cada vez más frecuente la existencia conjunta de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, la existencia de complicaciones graves, la presencia de gérmenes resistentes a $\mu\beta$ -lactámicos o a tetraciclinas, resultando, además, difícil de diagnosticar la infección por clamidias.

5. Infecciones por rickettsias. Son igualmente útiles las tetraciclinas y el cloranfenicol.
6. Otras infecciones. Las tetraciclinas se emplean en las neumonías atípicas producidas por *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Francisella* y *Legionella* (aunque en este último caso, las tetraciclinas constituyen una alternativa a la eritromicina). Así mismo, se utilizan en la fiebre recurrente, la melioidosis (junto con cloranfenicol si la infección es grave), la peste bubónica, la enfermedad de Lyme (en adultos) y la leptospirosis. Representan una terapéutica alternativa en el acné en su forma grave, la actinomicosis, el ántrax, la gastroenteritis provocada por *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* y ciertas infecciones producidas por *Listeria*. En las “diarreas del viajero” sirve la doxiciclina como alternativa del cotrimoxazol; a veces se utiliza de forma profiláctica, aunque en principio no es recomendable. Las tetraciclinas no son amebicidas pero modifican la flora necesaria para la supervivencia de las amebas pudiendo ser útiles en las amebiasis intestinales producidas por *Dientamoeba fragilis* (Mediavilla *et al.*, 2008).

En medicina veterinaria, las tetraciclinas tienen también un amplio uso. Las tetraciclinas se absorben bien por vía parenteral, alcanzando concentraciones eficaces en tejidos; son especialmente útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas mixtas. El espectro de acción de estos antibióticos frente a gérmenes Gram-positivos y Gram-negativos, rickettsias, clamidias, mycoplasmas y protozoos, las hace fármacos de elección en infecciones producidas por estos microorganismos patógenos.

Las formulaciones parenterales de tetraciclina de acción prolongada son eficaces en procesos conjuntivales causados por *Mycoplasma conjunctivae* y *Moraxella bovis* (Ewgu, 1992; Hartman y Geryl, 1993).

Las tetraciclinas tienen una considerable actividad frente a *Brucella abortus* y *Actinomyces* causantes de abortos en ganado bovino, y frente a bacterias anaerobias (Cohen *et al.*, 1995; 1996). En la leche, las tetraciclinas alcanzan concentraciones próximas a las que se alcanzan en sangre, cuando se administran por vía intravenosa, por ello, suelen ser los

antibióticos de segunda elección en el tratamiento de infecciones graves de la mama producida por bacterias Gram-positivas y en la colibacilosis. En infecciones genitourinarias de vacas preñadas causadas por *Ureaplasma diversum*, la administración intravenosa de soluciones de oxitetraciclina al 10% suelen dar buenos resultados (Rae *et al.*, 1993). En bovinos, dosis de 20 mg/kg pv de oxitetraciclina son eficaces frente a los esporozoitos del protozoo *Theileria parva* y *Theileria annulata* de la fase esquizonte. Si el tratamiento se realiza de forma tardía es inevitable la evolución de la enfermedad y la anemia de los animales (Bhattacharyulu y Singh, 1988; Spooner, 1990).

En ganado porcino, las tetraciclinas se suelen emplear para tratar la rinitis atrófica, enfermedad de las vías respiratorias bajas causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronquiseptica*, *Streptococcus suis* y la adenomatosis proliferativa. La utilización de oxitetraciclina se suele hacer en la forma farmacéutica de acción prolongada ('*long acting*') a dosis de 20 mg/kg pv vía parenteral, cada 24 horas, es eficaz en el tratamiento y la profilaxis de la neumonía inducida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kiorpes *et al.*, 1989). En equinos, las tetraciclinas no son de uso muy general por producir en estos animales numerosos efectos adversos. Sin embargo, las tetraciclinas se utilizan para el tratamiento de pleuritis causada por *Mycoplasma felis* y para tratar la erlichiosis causada por *Ehrlichia risticii*. Principalmente, la oxitetraciclina se utiliza por vía intravenosa en infusión lenta. En caballos, las tetraciclinas son también de utilidad en la enfermedad de Lyme (Browning *et al.*, 1993). En yeguas preñadas se utilizan como antibióticos de uso preventivo de abortos y de leptospirosis por *Leptospira interrogans*.

En aves, las infecciones respiratorias causadas por *Chlamydia psittaci* se suelen tratar con oxitetraciclina a dosis de 50-100 mg/kg pv vía subcutánea, y a intervalos de 2 o 3 días; originándose niveles plasmáticos de 1 µg/ml.

En ganado ovino, la oxitetraciclina se emplea para el tratamiento del aborto enzoótico de las ovejas originado por *Chlamydia psittaci* o *Brucella*; los resultados obtenidos tanto en ensayos experimentales como en pruebas de campo, indican que formulaciones de acción prolongada de oxitetraciclina a dosis de 20 mg/kg pv a intervalos de dos semanas, iniciando el tratamiento en las 6-8 semanas antes del parto, hacen disminuir la presentación de abortos enzoóticos.

La tetraciclina es el fármaco de elección tanto para el tratamiento como para la prevención de la fiebre Q causada por *Rickettsia* y transmitida por picaduras de garrapatas. Dosis únicas de 5 mg/kg de oxitetraciclina en formulación de acción prolongada, pueden proteger a los corderos frente a estos microorganismos (Brodie *et al.*, 1988).

1.4. Valoración ecotoxicológica

El término Ecotoxicología fue introducido por Truhaut en 1969 y procede de la palabra "ecología" y "toxicología". La introducción de este término refleja una creciente preocupación por los efectos ambientales de las sustancias químicas sobre especies no humanas (Walker *et al.*, 1996). Truhaut (1977) definió a la ecotoxicología como la rama de Toxicología que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes de origen natural o sintético, a los constituyentes de los ecosistemas, animal, vegetal y microbiano, en un contexto integral”.

Walker (1996) define la ecotoxicología como el estudio de los efectos nocivos de las sustancias químicas en los ecosistemas. Asimismo establece una relación de las respuestas a los contaminantes en función de los diferentes niveles de organización de un ecosistema (**Figura 17**) donde detalla el aumento del tiempo de respuesta y la dificultad en la vinculación de los efectos producidos con la sustancia contaminante a medida que incrementa el nivel de organización.

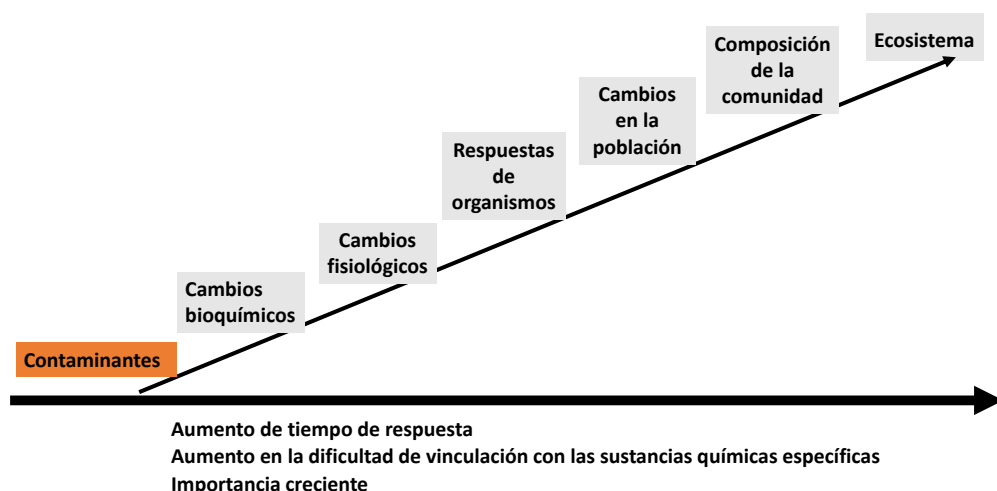


Figura 17. Relación esquemática de las respuestas vinculadas a los diferentes niveles de organización. (Walker *et al.*, 1996)

El objetivo primordial de la ecotoxicología es la identificación de los efectos que los contaminantes, de forma independiente o combinados con otros agentes de estrés, ejercen en el medio ambiente (Schirmer *et al.*, 2010), con el fin de predecir, y así disminuir o prevenir, los efectos perjudiciales sobre el mismo (Forbes, 1994). La evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes se realiza fundamentalmente a través de los ensayos ecotoxicológicos; dichos ensayos pueden implicar diversos niveles de organización biológica, desde las alteraciones moleculares a nivel celular hasta la valoración de efectos sobre los ecosistemas (Calow, 1993).

A medida que se desciende a lo largo de esta escala, los tiempos del ensayo se reducen y las condiciones del ensayo se vuelven más fácilmente controlables, por lo que las características que deben cumplir los ensayos (reproducibilidad, robustez, fiabilidad y repetibilidad) van aumentando. Por otro lado, si se aumenta la complejidad biológica de los ensayos empleando estudios poblacionales o de comunidades, es posible reproducir con mayor fiabilidad la complejidad de la realidad ecológica, ganando así en relevancia, pero perdiendo en fiabilidad, particularmente en el sentido de la capacidad para interpretar los efectos observados y su relación con el agente estresante, debido a la complejidad del sistema (Figura 18).

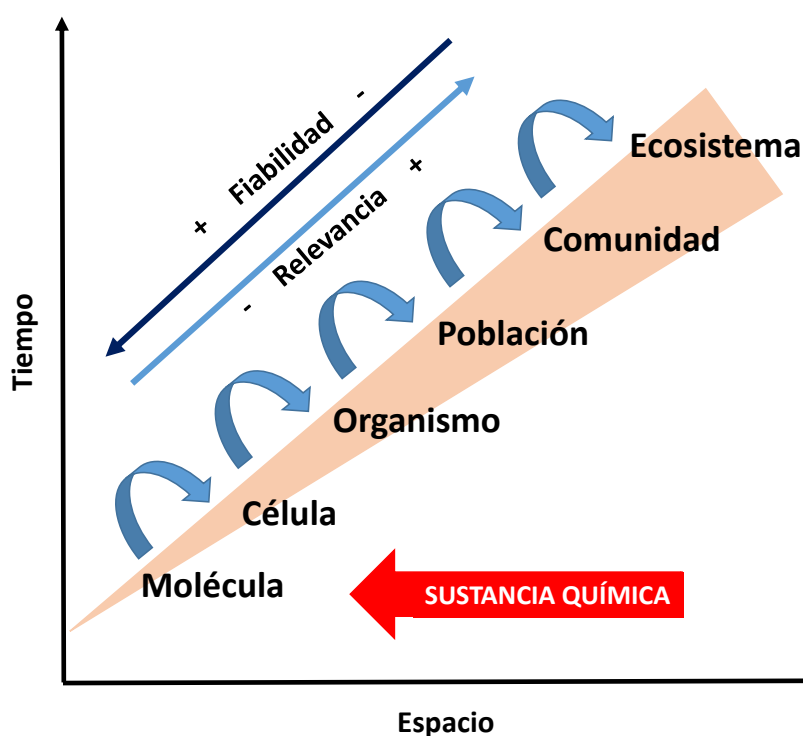


Figura 18. Relevancia y fiabilidad de los ensayos ecotoxicológicos
(Schirmer *et al.*, 2010).

Los ecosistemas, compuestos a su vez por biotopos formados por comunidades de seres vivos que agrupan a los microorganismos, plantas y animales en equilibrio dinámico con su entorno. Es oportuno destacar que, aunque cada uno tiene su autonomía, los ecosistemas, ya sean terrestres, aéreos o acuáticos, mantienen interrelaciones e interconexión armoniosa de tal manera que forman un todo coherente en la superficie del planeta: la biosfera. En el contexto de los equilibrios biológicos, son de gran importancia el estudio y la evaluación de los efectos nocivos de la contaminación química del medio ambiente sobre los distintos componentes de los ecosistemas (Truhaut, 1977).

La evaluación asume que si no hay efectos relevantes sobre los individuos, es decir no se altera su supervivencia, crecimiento y tasa de reproducción, no se alterarán las poblaciones ni las comunidades, y por ello no se esperan cambios tanto en la función como en la estructura de los ecosistemas. Para evaluar los riesgos para los organismos terrestres se estima la cantidad de sustancia que puede alcanzar el suelo en función de los usos; se asume que la sustancia se distribuye de forma homogénea en la capa superficial del suelo, y se compara la concentración así resultante con datos de toxicidad sobre organismos del suelo, obtenidos en el laboratorio, en ensayos en los que la sustancia química se ha homogenizado con el suelo, y que cubren tres grupos taxonómicos: plantas terrestres, invertebrados y microorganismos del suelo.

La exposición a través del suelo resulta mucho más complicada que a través del agua, ya que nos encontramos con varias vías de exposición actuando simultáneamente sobre los organismos (Fairbrother *et al.*, 2002). Debemos considerar, por un lado, la distribución del contaminante entre los diferentes elementos del suelo (agua de poro, aire, y una gran diversidad de partículas sólidas, que incluyen seres vivos, materia orgánica inerte, y diferentes elementos minerales). La distribución del contaminante se convierte en un complejo equilibrio dinámico, que se ve continuamente alterado por cambios de pH, temperatura, humedad, y potencial redox, entre otros. Pero además, los procesos de absorción de los contaminantes por los seres vivos son también complejos, así la exposición por vía oral se hace relevante tanto a través del agua de poro como del material particulado que ingieren muchos organismos del suelo; y del mismo modo, nos podemos encontrar con exposiciones dérmicas mixtas, por contacto con material particulado, absorción de sustancias disueltas en el agua de poro y absorción de gases desde el aire presente en el suelo.

Durante mucho tiempo, se había considerado que el único riesgo relevante debido a la liberación de medicamentos veterinarios en el medio ambiente venía ligado a la aparición de resistencias en poblaciones bacterianas. Actualmente no se puede obviar su posible impacto sobre otros organismos no diana, por tanto se trata de un problema complejo, no suficientemente cuantificado, que sugiere la necesidad de intensificar la investigación en este sentido.

En 1979, el grupo de expertos en ecotoxicología de la OCDE elaboró un informe donde se forjaron las directrices y consideraciones para la realización de los ensayos ecotoxicológicos así como una recopilación de los métodos de ensayo (OECD, 2006a).

Algunas de las principales consideraciones para la medición de la relación concentración / efecto en ecotoxicología se basan en que el daño al componente biótico de un ecosistema puede afectar a la función y estructura del sistema. La función incluye las relaciones complejas a través de las cuales se mantiene el ecosistema. Esto, sin embargo, solo es posible cuando existe una adecuada estructura de este sistema, ya que en el funcionamiento de los ecosistemas son de gran importancia las relaciones tróficas, que implican las transferencias de energía y nutrientes y que son parte de los ciclos naturales.

A este respecto, la distinción ecológica funcional entre productores primarios, productores secundarios, organismos consumidores y organismos de descomposición es útil para visualizar los elementos bióticos más importantes de estos ciclos naturales. Las perturbaciones ambientales generalmente se manifiestan como cambios en el número relativo o en la biomasa de los elementos del sistema o como ambos. Se pueden distinguir efectos biodepresores (mortalidad, disminución del crecimiento y la reproducción) y efectos bioestimulantes (eutrofización, inmigración, entre otros) que pueden ser perjudiciales para el ecosistema y como tales son indeseables.

La sustancia química en cuestión es transportada al receptor (el sistema biótico) a través del agua, el aire o el suelo. A este respecto, la frecuente (y práctica) distinción entre la contaminación del agua, del aire y del suelo no tiene relevancia ecotoxicológica, ya que la identidad del medio de transporte carece de la menor importancia. Sin embargo, en la práctica para la evaluación de los posibles efectos de las sustancias químicas, esta distinción es de suma importancia, ya que se utilizan diferentes métodos para determinar los efectos en cada uno de estos medios. A estos medios de transporte se pueden añadir "*redes alimentarias*" (incluyendo la forma simplificada de "*cadena alimentaria*") como una entidad separada a

causa de fenómenos específicos, tales como biomagnificación y la formación de metabolitos más o menos tóxicos.

Un punto de vista holístico implica que básicamente sólo deben ser estudiadas las relaciones de concentración-efecto entre las sustancias potencialmente nocivas y los sistemas bióticos que son representativos de ciertos tipos funcionales en el medio ambiente. En la **Tabla 1** se presenta un resumen de la importancia relativa de los diferentes compartimentos ambientales en el ecosistema. Aire, agua y suelo no son entidades bien definidas.

Tabla 1. La importancia relativa de los diferentes compartimentos ambientales del aire, agua y suelo en relación con algunas de sus propiedades (OECD, 2006a)

| | Contenido de los sistemas bióticos (hábitat) | Medio de transporte de la contaminación | | Riesgo de los productos químicos a las poblaciones presentes | Depósito de la contaminación | Uniformidad global de la composición | dilución |
|-------|--|---|----------------------|--|------------------------------|--------------------------------------|----------|
| | | Distancia de transporte | Volumen transportado | | | | |
| Aire | + | +++ | ++ | + | + | +++ | +++ |
| Agua | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| Suelo | +++ | + | + | ++ | +++ | + | + |

+ Ligera; ++ Moderada; +++ Considerable

Se puede observar, por ejemplo, que su importancia relativa depende de si los compartimentos ambientales son vistos como un hábitat, como un medio de transporte o como un sumidero para las sustancias químicas.

Una de las principales dificultades en ecotoxicología es decidir si un cambio observado es o no ecológicamente relevante; ya que esto resulta difícil, debido a las capacidades de los sistemas bióticos para reparar los daños y adaptarse a las condiciones adversas.

Se puede asumir que cualquier deterioro de la función y la estructura de un sistema biótico, especialmente a nivel de comunidades deben ser considerados como un efecto indeseable de la contaminación. Desde este punto de vista los efectos persistentes y/o irreversibles, que son perjudiciales para los organismos individuales, pueden ser menos importantes a nivel de la comunidad. La importancia ecológica de un efecto puede variar

ampliamente entre las especies debido, por ejemplo, a las diferencias en la tasa de reproducción o al intervalo de ciclo de vida.

Efectos importantes incluyen los principales eventos biológicos de: (1) la germinación y nacimiento, (2) la maduración, (3) la reproducción y, (4) la muerte, que en última instancia determinan la biomasa.

Otros efectos, tales como el deterioro de la respiración, el aumento de las oxidasas de función mixta, los cambios en la pigmentación, y los cambios de conducta, entre otros, pueden ser considerados como efectos secundarios que, indirectamente, pueden influir en parámetros de importancia ecológica.

Dosis *versus* concentración en ecotoxicología

Los ensayos toxicológicos tratan generalmente de determinar las relaciones dosis-respuesta. Esto se puede hacer para los animales terrestres a los que la sustancia ensayada se puede administrar por vía oral o vía parenteral.

En los ensayos ecotoxicológicos acuáticos esto es prácticamente imposible, en particular para los animales pequeños, debido a que la sustancia de ensayo se administra en el agua; en este caso se determina la relación concentración-efecto.

Sin embargo, las relaciones dosis-efecto, pueden ser estudiadas en ecotoxicología acuática al determinar mediante análisis químico la cantidad del compuesto ensayado presente en los organismos a ensayo.

Al extrapolar los resultados de los ensayos ecotoxicológicos debe tenerse en cuenta el hecho de que la sustancia a ensayar puede haber cambiado en el medio ambiente. La palabra "*dosis*" se utiliza para indicar cantidades administradas directamente o presentes en el organismo a ensayo, mientras que las cantidades presentes en el medio de ensayo o en el medio ambiente se denominan "*concentraciones ambientales*".

La concentración ambiental real depende en primer lugar de la cantidad de sustancia añadida, pero está muy influenciado por las propiedades físico-químicas de la sustancia química y el medio de transporte particular implicado (aire, agua, suelo, red alimentaria) en el que el sistema biótico se encuentra expuesto.

Las propiedades físico-químicas, como la volatilidad y solubilidad, determinan la distribución entre los diferentes compartimentos ambientales. Además, la sustancia química, puede ser modificada por factores ambientales antes de que alcance el sistema vivo que va a

ser afectado. Factores tales como la estabilidad físico-química (resistencia a la oxidación, hidrólisis, radiación), la adsorción y la biodegradabilidad determinarán qué fracción de la concentración ambiental inicial se mantendrá en el intervalo de proximidad de este sistema vivo final.

Por último, la dosis a la que puede estar expuesto un organismo vivo en situación de riesgo está influenciada por dos procesos de bioacumulación: (1) las sustancias químicas que se absorben fácilmente, pero sólo se liberan o eliminan lentamente, se pueden acumular dando concentraciones muy altas. Esto da lugar a que la concentración interna en los organismos acuáticos no coincida con la concentración externa (ambiental) de las sustancias químicas, y (2) las sustancias químicas también pueden llegar a los organismos diana (receptores) a través de la cadena alimentaria o redes alimentarias; esta suele ser la principal vía para los animales terrestres y, de nuevo para las sustancias químicas absorbidas rápidamente, pero de eliminación lenta, pueden dar lugar a niveles superiores de exposición en lugares críticos sensibles.

Aunque el fenómeno de la "*biomagnificación*" a través de la cadena alimentaria, como resultado de la "*bioacumulación*" secuencial puede ser menos importante que lo que se piensa, se debe tener en cuenta la exposición a través de alimentos para determinar la "*concentración ambiental prevista*" (PEC), un parámetro que es importante en la interpretación de los datos obtenidos a partir de los ensayos de toxicidad.

Para la planificación adecuada de los ensayos ecotoxicológicos, es deseable cierta información clave sobre las propiedades físico-químicas y de persistencia de la sustancia química a estudio, no sólo a causa de problemas de interpretación de las relaciones de concentración-efecto, sino también por razones operativas coherentes. Por ejemplo, serán necesarios diferentes sistemas de ensayo para la valoración de sustancias volátiles o hidrófobas. Es importante, además, comprobar la biodegradabilidad antes de llevar a cabo un ensayo de toxicidad acuática debido a que la biodegradabilidad no solo influye en la concentración real presente, ya que a veces puede conducir a resultados erróneos ya que la falta de oxígeno puede ser la causa de la muerte de los organismos acuáticos, mientras que la sustancia sólo es ligeramente tóxica o no es tóxica.

Tipos de ensayo ecotoxicológicos

En ecotoxicología la situación más difícil es la que consiste en la predicción de los efectos de concentraciones muy bajas de una sustancia química, mantenida durante largos

períodos de tiempo, y que afectan a las comunidades de organismos, dando lugar a fenómenos subletales e inter-específicos. Para este tipo de situaciones especiales es deseable realizar ensayos con sistemas multi-especies, pero no hay disponibles sistemas de ensayo estándar de tal naturaleza. Debido a estos factores se acepta, en general, que se debe de seguir un procedimiento secuencial (paso a paso) que, a partir de ensayos sencillos para todas las sustancias químicas, pero terminando con ensayos multi-especie más complejos y ensayos de campo para unas pocas sustancias que son de gran valor práctico, pero que han sido indicadas como potencialmente peligrosas para el medio ambiente.

Se deben de considerar los siguientes tipos de ensayos: (a) Ensayos a corto plazo con una sola especie; (b) Ensayos a largo plazo con una sola especie; (c) Ensayos con sistemas de múltiples especies; y (d) Ensayos con células o cultivos.

El ensayo inicial tiene por objeto encontrar indicaciones de la naturaleza de los efectos (detección cualitativa) y la obtención de una primera estimación del intervalo de concentración dentro del cual se producen estos efectos. En ecotoxicología esto significa que se deben tomar en cuenta los efectos sobre la función del sistema. Si la biomasa relativa de las especies que constituyen un sistema, se toma como base definitiva para un funcionamiento correcto, son de interés los parámetros mortalidad, reproducción, asimilación y crecimiento. Estos son los únicos parámetros que se pueden medir e interpretar de forma fiable y de manera rutinaria con las pruebas disponibles. En los ensayos ecotoxicológicos, es preferible utilizar los términos "*a corto plazo*" y "*a largo plazo*" en lugar de los términos "*agudo*" y "*crónico*".

Se debe tener especial atención en la selección de tipos de ensayos ecotoxicológicos (OECD, 2006a) para asegurar que las concentraciones en el ensayo se mantienen constantes durante períodos de ensayo largos; en todo caso se debe de comprobar o revisar periódicamente. En general, para los organismos acuáticos distinguimos entre:

- **Ensayo estático** en el que se añade la sustancia química a ensayo una vez en el sistema de ensayo; no se cambia el medio de ensayo durante el experimento;
- **Ensayo semi-estático** en el que se sustituye periódicamente el medio de ensayo y la sustancia a ensayo;
- **Ensayo de flujo** (flujo continuo o intermitente) en el que se suministra el medio y la sustancia a ensayo a una velocidad y concentración constante para el organismo a ensayo.

Este último sistema de ensayo simula algunas condiciones naturales de mejor grado que un ensayo estático, mientras que, por otra parte, hay un mayor grado de seguridad de que las concentraciones a las que el organismo a ensayo ha sido expuesto durante el periodo del ensayo se han mantenido constantes.

En la revisión actual de los tipos de ensayos ecotoxicológicos disponibles, es obvio que los ensayos con organismos acuáticos son abundantes, mientras que los ensayos con organismos terrestres son escasos. Dado que la mayoría de los contaminantes químicos se encuentran eventualmente en el agua, y también por razones prácticas, la facilidad de ensayo, permite utilizar animales acuáticos para una primera indicación de los efectos ambientales de las sustancias químicas (OECD, 2006a).

En los ensayos ecotoxicológicos, para la evaluación de los efectos de sustancias químicas, debemos estar interesados tanto en la función como en la estructura del medio biótico total. La función está relacionada con la dinámica de los ciclos geo-químicos y la entrada de energía, mientras que la estructura está relacionada con las biomásas relativas de especies coexistentes.

No es posible seleccionar un pequeño número de especies que puedan ser consideradas como representativas para cualquier grupo taxonómico; por lo tanto, cualquier decisión tomada sobre esta base debe ser arbitraria. Una elección basada en tipos funcionales ecológica o fisiológicamente diferentes parece ser más apropiada. Teniendo en cuenta esto hay que destacar que todos los ensayos sólo sirven como modelos y en consecuencia pueden tener defectos.

Se requiere un enfoque práctico de unos procedimientos secuenciados a partir de ensayos con una sola especie en condiciones de laboratorio y el establecimiento de la relación concentración/efecto dentro de los límites definidos de tiempo. Un procedimiento secuencial (paso por paso) podría implicar tres pasos: (i) el nivel básico, (ii) el nivel de confirmación y (iii) el nivel definitivo (OECD, 2006a).

En el nivel básico se deben utilizar ensayos simples que indican posibles efectos en algunos tipos de organismos funcionalmente importantes. La función ecológica se considera de mayor importancia que cualquier "representatividad" propuesta para una especie en particular para compartimentos ambientales singulares. Como ensayos del nivel básico, se encuentran el ensayo de inhibición del crecimiento de algas; el ensayo de reproducción de 14

días de duración (incluyendo una prueba de inmovilización aguda) en *Daphnia* sp.; y el ensayo de toxicidad aguda en peces (OECD, 2006a).

La razón de usar más de una especie de ensayo es la variación en la sensibilidad de las distintas especies a un tipo de sustancia química tóxica que no tiene por qué coincidir necesariamente. Tampoco es práctico elegir una sola especie para ser utilizada en los ensayos, ya que esa especie de organismo puede no estar disponible en todos los ecosistemas. Un buen conocimiento y experiencia con las condiciones óptimas de cría y ensayar en las especies autóctonas de la zona de interés es más valioso que una normalización internacional rigurosa.

En el nivel de confirmación se debe utilizar el ensayo que de la información más completa si existe sospecha en cuanto a la aceptabilidad de una sustancia química que se habría planteado anteriormente en el nivel básico. La sospecha no debe basarse única y necesariamente en los resultados de los ensayos ecotoxicológicos. En general, estos ensayos pueden ser los de carácter más complicado, relacionados con compartimentos ambientales específicos o adicionales. También se deben considerar la exposición a largo plazo y las rutas específicas de contaminación dependiendo de las propiedades químicas y el grado de contaminación ambiental esperado (OECD, 2006a).

En el nivel definitivo pueden ser necesarios ensayos en algunos casos especiales, por ejemplo, donde es probable que estén involucrados apreciables concentraciones ambientales de la sustancia química y/o existe alguna indicación de posible peligro ambiental. Para evaluar los efectos en los sistemas experimentales puede que sea necesario aproximarse más estrechamente a las condiciones naturales mediante el empleo de sistemas de multi-especies de organismos.

En los ensayos ecotoxicológicos, es deseable obtener algún indicio de la magnitud de los efectos que se esperan. Como las sustancias químicas pueden causar diferentes efectos en distintos organismos en concentraciones divergentes, puede ser suficiente una indicación del rango. Es más importante llevar a cabo ensayos con varias especies de organismos, quizás de diferentes taxones, con el fin de obtener una idea de la variabilidad natural que llevar a cabo un ensayo muy preciso con una sola especie de organismo.

En general, no se puede lograr una precisión muy alta en el ensayo ecotoxicológico debido a la variación que existe de forma natural dentro de las poblaciones de organismos. La estandarización de las condiciones de ensayo es, en general, posible, pero muchos de los

llamados métodos normalizados (estandarizados) son altamente arbitrarios en su suposición en cuanto a los parámetros que han de ser normalizados y, por lo tanto, tienen poca relevancia desde el punto de vista ecotoxicológico. Uno de los parámetros que parece ser susceptibles de normalización es el grado de variación en el organismo de ensayo, y para reducir este grado de variación se pueden utilizar poblaciones puras (OECD, 2006a).

Debido a la variabilidad dentro de las poblaciones, los datos obtenidos sólo se pueden expresar en términos de probabilidad específica a un nivel de confianza establecido, que se puede esperar que ocurra el evento de que se trate. Este tipo de incertidumbre inevitable, resultante de la variabilidad inherente, pero que puede ser tratada estadísticamente; no debe confundirse con la debida a la mala experimentación. Por todo ello es necesario aplicar las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en los ensayos ecotoxicológicos.

Sin embargo, en los ensayos de multi-especies, es muy difícil lograr una alta precisión debido a la naturaleza multifactorial de la variabilidad de tales sistemas y los diferentes requisitos de las especies de organismos que los componen.

El grupo de expertos en Física-Química de la OCDE (1979, 2006b) elaboró un informe que incluía consideraciones detalladas del enfoque, objetivos, y principios generales para los ensayos físico-químicos a emplear en la evaluación del riesgo ambiental de las sustancias químicas.

Las sustancias químicas de origen antrópico que se liberan en el medio ambiente pueden originar reacciones bioquímicas indeseables. El riesgo que se plantea por una sustancia química liberada al medio ambiente está en función de varios factores, entre los que la concentración y la exposición dependen en gran medida de las propiedades físico-químicas de la sustancia química.

La concentración y la exposición dependerán de una variedad de parámetros de entrada, entre los que se destacan: (i) la tasa de emisión o liberación de la sustancia en el medio ambiente, (ii) la movilidad de la sustancia en el medio ambiente, (iii) la degradación de la sustancia en el medio ambiente (abiótica y biótica), y (iv) la posible acumulación (biótica y abiótica) (OCDE, 2006b).

Además de estos factores se deben tener en consideración otros factores como: (i) el modo de liberación en el medio ambiente, (ii) las condiciones climáticas / meteorológicas / geográficas, y (iii) las densidades de población (microorganismos, plantas, animales, seres humanos). Frecuentemente se utiliza la estimación del tipo peor caso posible (es decir, la

estimación de la peor concentración ambiental posible) para proporcionar un límite superior en la evaluación predictiva del riesgo ambiental (OCDE, 2006b).

Las estimaciones de las tasas de emisión o liberación para una sustancia química, están basadas en datos sobre las cantidades comercializadas, su uso y los patrones de eliminación. Es obvio, sin embargo, que el conocimiento de las propiedades físico-químicas (por ejemplo, estado físico, presión de vapor, solubilidad en agua, densidad, y tamaño de partícula, entre otros), ayudan a estimar las probabilidades de liberación. Estas propiedades permiten predecir que parte(s) del ecosistema pueden verse afectadas por la liberación de la sustancia química y, además, nos puede indicar la forma en la que la sustancia puede estar presente (OCDE, 2006b).

La movilidad de una sustancia en el medio ambiente se define como la capacidad de una sustancia para moverse dentro del medio ambiente. Está determinada por el comportamiento de distribución de la sustancia entre los medios de comunicación de cada compartimento medio ambiental (es decir, ecosistemas aéreo, acuático y terrestre) y el modo de transporte dentro de cada compartimento medioambiental. Un conocimiento de parámetros físico-químicos como: curva de presión de vapor, solubilidad en agua, adsorción / desorción, volatilidad de la solución acuosa, capacidad de formación de complejos, densidad de líquidos y sólidos, distribución de tamaño de partícula, viscosidad de los líquidos y tensión superficial de las soluciones acuosas, permiten una estimación de la distribución de una determinada sustancia entre el aire, el agua y el suelo, después de su liberación al medio ambiente; por lo tanto, el conocimiento de las propiedades físico-químicas de una nueva sustancia (previamente no descrita en la bibliografía científica) es de gran importancia para una evaluación predictiva de riesgo (OCDE, 2006b).

En principio, es posible obtener una estimación de la distribución de una sustancia a partir de un conocimiento de los parámetros físico-químicos, siempre y cuando los efectos de acumulación no sean significativos y la degradación en uno o más de los compartimentos medio ambientales pueda ser despreciable (es decir, para las sustancias persistentes). Con el conocimiento de la tasa de degradación en cada medio, puede estimarse el comportamiento de las sustancias menos persistentes. Sin embargo, el progreso en este campo debe esperar a que se realicen avances considerables en la modelización del medio ambiente y mediciones más fiables de las tasas de degradación (OCDE, 2006b).

Para obtener una estimación de la exposición ambiental a la sustancia química, además de considerar las estimaciones de la movilidad, también son necesarias estimaciones tanto de la desaparición (degradación, mineralización) como de la acumulación local específica de la sustancia (OCDE, 2006b).

Algunos de los ensayos físico-químicos son muy adecuados como ensayos de “cribado” para la degradación y, en particular, para la acumulación. Por ejemplo, el conocimiento del coeficiente de reparto n-octanol/agua puede ser utilizado para predecir el comportamiento de acumulación de una sustancia, mientras que el comportamiento de la hidrólisis es una faceta importante de la degradación cuando la sustancia está en contacto con el agua (OCDE, 2006b).

El objetivo de la Ecotoxicología es la evaluación, observación y predicción del destino y efectos de sustancias en el medio ambiente, así como proporcionar una base científica de evaluación para decidir que sustancias pueden ser liberadas en el medio ambiente o son tolerables desde el punto de vista ambiental y en qué cantidades.

La Evaluación de Impacto Ambiental (EIA) de los medicamentos veterinarios está basada en que el riesgo es producto de la valoración de la exposición, destino y efectos del medicamento veterinario para el compartimento ambiental que concierna (EMEA, 2003).

Entre los requisitos relativos a los medicamentos veterinarios tanto inmunológicos como no inmunológicos, se incluye la obligatoriedad, para la autorización de comercialización, de llevar a cabo una serie de estudios sobre la inocuidad de los medicamentos y sus residuos. Uno de estos estudios es el de la **Ecotoxicidad** que tiene como objeto evaluar los efectos nocivos para el medio ambiente que puede provocar el uso del producto, y definir las medidas que puedan ser necesarias para reducir el riesgo.

En 1996, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) inicio un programa trilateral (Unión Europea-Japón-USA) titulado “International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products” conocido como VICH, con el objetivo de normalizar los requerimientos técnicos para el registro de productos veterinarios.

El resultado de este programa fue la elaboración de las siguientes guías metodológicas para la valoración del impacto ambiental de los medicamentos veterinarios:

- Environmental Impact Assessment (EIA) for veterinary medicinal products Phase I. (VICH Topic GL6. Ecotoxicity Phase I). (EMEA, 2000)

- Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAs) for veterinary medicinal products Phase II (VICH Topic GL38. Ecotoxicity Phase II). (EMEA, 2003)
- Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH Guidelines GL6 and GL38. (EMEA, 2008)

El propósito de estas guías metodológicas es la valoración del potencial de los medicamentos veterinarios para afectar a especies no diana en el medio ambiente, incluyendo especies acuáticas y terrestres. Ante la imposibilidad de evaluar los efectos de los medicamentos veterinarios, posteriormente a su administración en las especies diana en todas las especies que puedan estar expuestas a través del medioambiente, los niveles taxonómicos ensayados están previstos para servir como indicadores del amplio rango de especies presentes en el medio ambiente.

Los requerimientos legales en la UE sobre la evaluación del riesgo ambiental de los medicamentos veterinarios se encuentran en las Directivas 92/18/CEE y 2001/82/CE transpuestas a nuestro ordenamiento jurídico en el Real Decreto 109/1995 y el Real Decreto 1246/2008. La Orden PRE/2833/2009 por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente (BOE nº 257, de 24 octubre 2009) señala los estudios de seguridad necesarios para predecir los posibles riesgos medio ambientales por el uso de medicamentos veterinarios no inmunológico.

Esta Orden indica que se evaluará el riesgo medioambiental en busca de los posibles efectos dañinos del uso del medicamento veterinario y para determinar el riesgo de tales efectos. En la evaluación se identificará asimismo cualquier medida preventiva que pueda ser necesaria para reducir tal riesgo. Esta evaluación se realizará normalmente en **dos fases**. La primera fase de la evaluación se realizará en todos los casos. Se indicará la posible exposición del medio ambiente al medicamento y el riesgo asociado con tal exposición, teniendo especialmente en cuenta los puntos siguientes: (i) las especies animales de destino y la utilización propuesta, (ii) el modo de administración y, en particular, el grado probable de incorporación directa del producto al ecosistema, (iii) la posibilidad de que el medicamento, sus principios activos o sus metabolitos pasen de los animales tratados al medio ambiente y su persistencia en las excretas, y (iv) la eliminación de medicamentos veterinarios no utilizados u otros residuos.

En la segunda fase de la evaluación se investigará de manera específica el destino y los efectos del medicamento en ecosistemas particulares. Se tendrá en cuenta la amplitud y duración de la exposición del medio ambiente al medicamento y la información disponible sobre las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas o toxicológicas de las sustancias en cuestión.

1.5. Justificación del trabajo y objetivos

En función de lo descrito previamente sobre el impacto potencial de los medicamentos sobre el medio ambiente por el uso humano, veterinario y agrícola, no solo constituye un problema con respecto a las resistencias antibacterianas, ya que al ser concebidos los antibióticos con actividad antibacteriana pueden producir efectos sobre los microorganismos localizados en el compartimento terrestre y acuático. Por otra en el para valorar los efectos ecotoxicológicos en el ámbito terrestre se necesitan estudios de toxicidad sobre plantas terrestres e invertebrados y en ámbito acuático estudios en plantas acuáticas vasculares

Se conoce que los medicamentos veterinarios se emplean en animales para consumo para proteger su salud y así evitar pérdidas económicas, y garantizar un suministro de alimentos inocuos. La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico de amplio espectro empleado en medicina humana y veterinaria producido a partir del actinomiceto *Streptomyces rimosus* que se utiliza para el control de bacterias, hongos y organismos similares a micoplasmas. La presencia de residuos de oxitetraciclina en estiércoles y purines, procedentes de los animales tratados, y ser empleados como fertilizantes en suelos agrícolas conlleva el riesgo de entrada de oxitetraciclina en el ecosistema terrestre pudiendo actuar sobre organismos no-diana, como invertebrados terrestres, que juegan un papel importante en la degradación y transformación de la materia orgánica. Una interferencia de la oxitetraciclina en procesos del suelo podría alterar el ciclo de los nutrientes, afectando la fertilidad del suelo. No obstante el destino final directo o indirecto de la oxitetraciclina suele ser el compartimento acuático (aguas superficiales o subterráneas).

En función de todo lo expuesto, los objetivos del trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar de los efectos de oxitetraciclina en el medio terrestre mediante un ensayo de toxicidad en el invertebrado terrestre *Eisenia andrei* B. (OECD, 1984)].
2. Estudio de los efectos de oxitetraciclina en un sistema multi-especie en suelo valorando la germinación y crecimiento de plántulas terrestres mono y dicotiledóneas [*Triticum aestivum*,

Brassica napus y *Vicia sativa*) (OECD, 2006c)], mortalidad y biomasa en el invertebrado terrestre *Eisenia andrei* y efectos en los microorganismos terrestres.

3. Estudiar los efectos de oxitetraciclina en el medio acuático [ensayo de inhibición del crecimiento en la planta acuática *Lemna minor* L. (OECD, 2006d).

MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Protocolo y diseño experimental

2.1.1 Ensayo de inhibición del crecimiento en la planta acuática *Lemna minor*

Las diferencias fisiológicas de las plantas acuáticas vasculares con respecto a otros grupos taxonómicos, considerados clave en los protocolos de evaluación del riesgo ambiental en el compartimento acuático (peces, invertebrados acuáticos y algas unicelulares), han sido reconocidas en la evaluación del riesgo de los productos herbicidas, dada su sensibilidad a ciertas moléculas (por ejemplo, clorato) con mecanismos de acción específica (Pro *et al.*, 2003)

Siguiendo la guía de la OECD 221 (OECD, 2006d), se realiza un ensayo de exposición, en la planta de agua dulce *Lemna minor*, a distintas concentraciones de oxitetraciclina clorhidrato (OTC), para evaluar los efectos en el crecimiento vegetativo de la planta.

El medio de ensayo empleado para el crecimiento la planta y la realización de las distintas concentraciones de OTC fue una modificación del Swedish Standard (SIS) recomendado por la guía OECD 221 (OECD, 2006d).

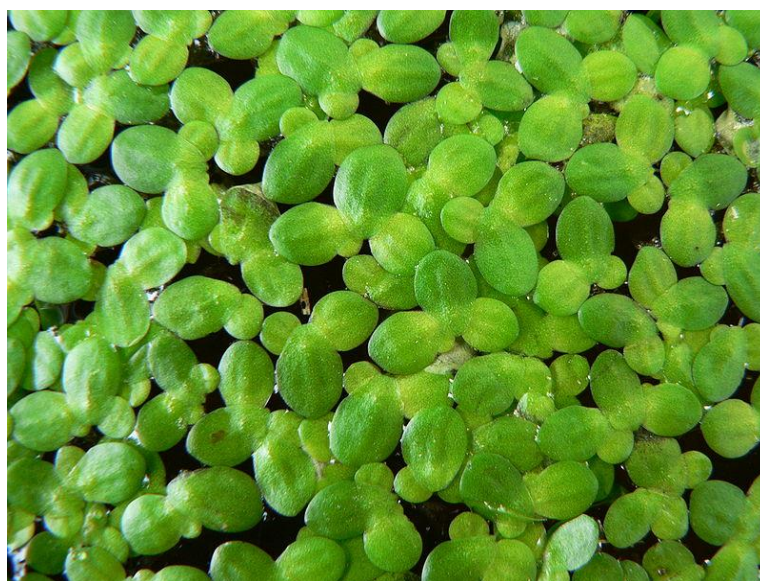
El ensayo se llevó a cabo en condiciones estáticas sin renovación del medio de ensayo y el tiempo de exposición fue de 7 días. Se realizan 3 réplicas de cada uno de los grupos de tratamiento (5 tratamientos), y un grupo control. Las concentraciones de OTC a ensayo fueron de 1, 2, 4, 8 y 16 µg/ml en el medio de crecimiento SIS. En el grupo control solo se empleó medio de crecimiento SIS sin OTC. Las concentraciones de OTC en el medio de crecimiento fueron medidas tras el tratamiento a los 0, 1, 2, 3, 4, y 7 días. Los puntos finales empleados para la valoración de efectos de la OTC sobre la planta son: inhibición del crecimiento (E_rC_x) e inhibición del rendimiento (E_yC_x) basados en tres parámetros principales: número de frondas (se define fronda como la unidad más pequeña capaz de reproducirse, realmente es una "hoja" de la planta acuática) peso fresco y peso seco a los 7 días de exposición. También se determina la temperatura, el pH, la conductividad eléctrica (µSiemens/cm a 25 °C) y la iluminancia (lux) en el medio de crecimiento.

Especie empleada en el ensayo

La especie empleada en este ensayo, la planta acuática *Lemna minor*, proviene de un cultivo que el grupo del profesor Elias Landolt, del Instituto Geobotánico de Zurich, nos proveyó, en el año 1999, y que desde entonces se ha venido sub-cultivando en el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y es la especie empleada en este ensayo.

Descripción de *Lemna* sp.

La planta acuática comúnmente conocida como lenteja de agua, *Lemna* sp., pertenece a la familia Lemnaceae de amplia distribución mundial, plantas también conocidas como plantas de “duckweed” (hierbas de pato). Su diferente apariencia y taxonomía se han descrito de forma exhaustiva (Hillman, 1961; Landolt, 1986). *Lemna gibba* y *Lemna. minor* son las especies representativas de las zonas templadas y se utilizan comúnmente para ensayos de toxicidad. Ambas especies tienen un vástago discoidal flotante (fronda) y una raíz sumergida muy fina que nace del centro de la superficie inferior de cada fronda.



Planta acuática *Lemna minor*

Lemna sp. no produce flores habitualmente y las plantas se reproducen vegetativamente produciendo nuevas frondas (Björndahl, 1982). En comparación con las plantas más viejas las más jóvenes tienden a ser más pálidas, tener raíces más cortas y se componen de dos a tres frondas de diferentes tamaños. El pequeño tamaño de *Lemna*, su estructura simple, su reproducción asexual y el corto tiempo de generación hacen que las plantas de este género

sean muy adecuadas para los ensayos de laboratorio (Wang 1986, 1990b). Debido a la probable variación en la sensibilidad entre especies, sólo son válidas las comparaciones de sensibilidad dentro de una especie.

Preparación del medio de ensayo Swedish Standard (SIS)

El medio de ensayo SIS consta de 7 soluciones stock (**Tabla 5**). Las soluciones stock I a V se esterilizan en autoclave (120 °C, 15 minutos) o por filtración en membrana (aproximadamente 0,2 micras de tamaño de poro). Las soluciones VI y VII (opcional) no deben esterilizarse en autoclave, se esterilizan por filtración de membrana. Las soluciones stock estériles deben conservarse en lugar fresco y oscuro. Las soluciones I a V deben ser desechadas después de seis meses, mientras que las soluciones VI y VII (opcional) tienen una vida útil de un mes.

Tabla 5. Composición del medio de ensayo Swedish Standard (SIS)

| Solución stock N° | Sustancia | Fórmula | Solución stock (g/l) | Medio preparado (mg/l) | Medio Preparado | |
|-------------------|--|---|----------------------|------------------------|-----------------|----------------------|
| | | | | | Elemento | Concentración (mg/l) |
| I | | | | | | |
| | Sodio nitrato | NaNO ₃ | 8,5 | 85 | Na | 32 |
| | di-Potasio hidrógeno fosfato | K ₂ HPO ₄ | 1,34 | 13,4 | N | 14 |
| | | | | | K | 6,0 |
| | | | | | P | 2,38 |
| II | | | | | | |
| | Magnesio sulfato 7-hidrato | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 15 | 75 | Mg | 7,4 |
| | | | | | S | 9,8 |
| III | | | | | | |
| | Calcio cloruro 2-hidrato | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 7,2 | 36 | Ca | 9,8 |
| | | | | | Cl | 17,5 |
| IV | | | | | | |
| | Sodio carbonato | Na ₂ CO ₃ | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | | | | | | |
| | Ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 1,0 | 1,00 | B | 0,17 |
| | Manganeso II cloruro 4-hidrato | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0,20 | 0,20 | Mn | 0,056 |
| | Sodio molibdato 2-hidrato | Na ₂ Mo ₄ · 2H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Mo | 0,004 |
| | Zinc sulfato 7 hidrato | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0,050 | 0,050 | Zn | 0,011 |
| | Sulfato cúprico pentahidrato | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,0050 | 0,0050 | Cu | 0,0013 |
| | Cobalto II nitrato 6 hidrato | Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Co | 0,0020 |
| VI | | | | | | |
| | Hierro cloruro 6-hidrato | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 0,17 | 0,84 | Fe | 0,17 |
| | Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 0,28 | 1,4 | - | - |
| VII | | | | | | |
| | Ácido sulfónico 4-morfolino propano (MOPS buffer) | C ₇ H ₁₅ NO ₄ S | 490 | 490 | - | - |

Para preparar un litro de medio de ensayo SIS añadir a 900 ml de agua desionizada las siguientes cantidades:

- 10 ml de solución stock I
- 5 ml de solución stock II
- 5 ml de solución stock III
- 5 ml de solución stock IV
- 1 ml de solución stock V
- 5 ml de solución stock VI
- 1 ml de solución stock VII

El pH se ajusta a $6,5 \pm 0,2$ con HCl o NaOH 0,1 M o 1 M y se ajusta el volumen a 1 litro con agua desionizada.

Sustancia a ensayo

Nombre común: oxitetraciclina clorhidrato

Fórmula molecular: $C_{22}H_{24}N_2O_9$ HCl

Peso molecular: 496,90 g/mol

Calidad: 95-100.5 %

Casa comercial: PANREAC (ref. 374948 1606)

Número CAS: 2058-46-0

Número CE: 218-161-2

Contenido en agua: 2%

Preparación de las concentraciones a ensayo

Por dilución 1:1 de una disolución de OTC HCl de 16 µg/ml en el medio de crecimiento (SIS) obtenemos las concentraciones de 8, 4, 2 y 1 µg OTC/ml; de cada disolución se vierten a cada recipiente de ensayo 100 ml.

Finalmente tendremos los siguientes tratamientos a las concentraciones:

| | | |
|---------|---------------|--------------|
| Control | Control | |
| T1 | Tratamiento 1 | 1 µg/ml OTC |
| T2 | Tratamiento 2 | 2 µg/ml OTC |
| T3 | Tratamiento 3 | 4 µg/ml OTC |
| T4 | Tratamiento 4 | 8 µg/ml OTC |
| T5 | Tratamiento 5 | 16 µg/ml OTC |

Diseño experimental

En cada uno de los recipientes del ensayo, conteniendo 100 ml de cada tratamiento de OTC (5 tratamientos, dosis de aplicación única: 1, 2, 4, 8, 16 µg OTC/ml), se introducen 3 colonias con 4 frondas cada una (12 frondas por vaso). Todos los recipientes del ensayo se distribuyen de manera aleatoria en una cámara climática con condiciones de luz y temperatura controladas. El ensayo es estático y sin renovación del medio de ensayo, y la duración del mismo es de 7 días.

Condiciones ambientales del ensayo

Recipiente de ensayo: vasos de precipitado de 150 ml de capacidad

Tipo de luz: fluorescentes (OSRAM L 30W/865, Lumilux Cool Day light)

Fotoperiodo 16 horas luz – 8 horas oscuridad

Temperatura $26,3 \pm 4,5$ °C

Humedad relativa $42,0 \pm 12,5\%$

Mediciones y determinaciones analíticas

Durante el ensayo, se procedió al recuento diario del número de frondas, el peso fresco y el peso seco solo se determinan al inicio y al final del ensayo. Los valores de número de frondas, peso fresco y peso seco obtenidos se emplean para determinar la tasa específica de

crecimiento y el rendimiento de la planta tras el tratamiento con OTC (5 tratamientos, dosis de aplicación única: 1, 2, 4, 8, 16 µg OTC/ml)

Además se controlan condiciones ambientales del ensayo mediante la determinación de la iluminancia, el pH, la conductividad eléctrica y la temperatura, en cada uno de los recipientes del ensayo. La tasa específica de crecimiento y el rendimiento nos definen la toxicidad de la sustancia problema (OTC) en la planta acuática *Lemna minor*.

Los días 0, 1, 2, 3, 4 y 7, se toman 2 ml del medio crecimiento de cada envase del ensayo, para la cuantificación, por análisis químico (HPLC), de la concentración de OTC. Los análisis se realizan el mismo día de la toma de muestras.

Los parámetros peso fresco y peso seco (60°C) se determinan al inicio del ensayo en una muestra de frondas idéntica a la empleada como inóculo en los recipientes del ensayo y también al final del ensayo en las plantas en todos los niveles de tratamiento incluido el grupo control. Para determinar el peso fresco, se recogen todas las frondas y raíces de cada recipiente del ensayo, se enjuagan con agua desionizada y se transfieren a eppendorfs (con 1 pequeño agujero en su parte inferior de $\varnothing \leq 1$ mm), previamente tarados. Estos eppendorfs, con las plantas, se colocan en 1 tubo de polietileno ($\varnothing = 13$ mm y altura = 75 mm) y este tubo a su vez en otro tubo ($\varnothing = 16$ mm y altura = 100 mm) y se centrifugan a temperatura ambiente, para la eliminación del exceso de agua, a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El agua de las plantas queda en el primer tubo y los eppendorfs con las plantas (colonias, frondas y raíces) escurridas se pesan en balanza analítica de precisión. Finalmente, el peso fresco se obtiene por diferencia de peso con el eppendorf previamente tarado. Para determinar el peso seco, los eppendorfs conteniendo las plantas, una vez obtenido el peso húmedo, se llevan a estufa a 60 °C, durante 24 horas hasta peso constante. Una vez enfriados en un desecador se pesan en balanza analítica de precisión y, por diferencia de pesos se obtiene el peso seco.

Determinación de la tasa específica de crecimiento y del rendimiento

- (a) *Tasa específica de crecimiento*: se calcula sobre la base de los cambios en los logaritmos de los números de frondas, y, además, sobre la base de los cambios en los logaritmos de otro parámetro (el peso fresco o peso seco) con el tiempo (día) en los controles y cada grupo de tratamiento.
- (b) *Rendimiento*: se calcula sobre la base de cambios en el número de frondas y, además, sobre la base de los cambios en otro parámetro (peso fresco o peso seco) en los controles y en cada grupo de tratamiento hasta el final del ensayo.

La *tasa específica de crecimiento* (μ): durante un periodo de tiempo determinado, se calcula como el incremento logarítmico del crecimiento del parámetro-número de frondas- y otro parámetro (peso fresco o peso seco), utilizando la siguiente fórmula para cada control y tratamientos:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

siendo:

- μ_{i-j} : tasa específica de crecimiento entre los tiempos día 0 (i) y día transcurrido tras tratamiento (j)
- N_i : número de frondas en el control al inicio del ensayo
- N_j : número de frondas tras tratamiento a un tiempo (j)
- t: tiempo (días) transcurrido entre la medida a tiempo (i) y a tiempo (j)

El valor de la tasa específica de crecimiento se calcula, para cada grupo de tratamiento y control, junto con estimaciones de la varianza.

Porcentaje de inhibición de la tasa específica de crecimiento (I_r): El I_r se calcula para cada grupo de tratamiento del ensayo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

siendo:

- $\%I_r$: porcentaje de inhibición de la tasa específica de crecimiento
- μ_C : promedio de μ en el grupo control
- μ_T : promedio de μ en el grupo de tratamiento

El *rendimiento* (y): Los efectos sobre el rendimiento se determinan sobre la base de dos parámetros medidos, número de frondas y otro parámetro medido (peso fresco o peso seco) en cada recipiente de ensayo al inicio y al final del ensayo. Para el peso fresco o el peso seco, la biomasa (peso) de partida se determina sobre la base de una muestra de hojas tomadas del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo.

Para cada grupo de tratamiento y control del ensayo, se calcula un valor promedio del rendimiento junto con estimaciones de la varianza.

El porcentaje de inhibición media del rendimiento (% I_y) se calcula para cada grupo de tratamiento mediante la siguiente formula:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

siendo:

- % I_y : porcentaje de reducción en el rendimiento
- b_C : la biomasa final para el grupo de control
- b_T : la biomasa final en el grupo de tratamiento

El número de frondas (hojas), así como cualquier otro parámetro determinado, (peso fresco o peso seco), se tabulan junto con las concentraciones de OTC obtenidas en cada tiempo de medición. El posterior análisis de datos, por ejemplo, para estimar una LOEC (concentración más baja de efecto adverso observable), NOEC (concentración sin efecto adverso observable) o EC_x (concentración eficaz). La estimación de la EC_x (por ejemplo, EC_{50}) debe basarse tanto en la tasa específica de crecimiento (E_rC_x) como en el rendimiento (E_yC_x), cada una de los cuales, a su vez, deben basarse en el número de frondas y otro parámetro adicional (peso fresco o peso seco).

Los parámetros de toxicidad son, por tanto, cuatro valores de EC_x para cada nivel x de inhibición calculada:

E_rC_x (número de frondas)

E_rC_x (peso fresco o peso seco)

E_yC_x (número de frondas)

E_yC_x (peso fresco o peso seco)

2.1.2. Ensayo de toxicidad aguda en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

El método empleado es una modificación del ensayo de toxicidad aguda para lombriz de tierra de la OECD n° 207 (OECD, 1984). La modificación de este ensayo con respecto a la guía de la OECD n° 207 ha consistido en incrementar el tiempo de duración del ensayo de 14

a 21 días, y también el suelo artificial ha sido sustituido por un suelo agrario de ensayo al que se le adiciona arena lavada de río en proporción 1:1 para simular el “peor caso posible” (un alto porcentaje de arena y un bajo porcentaje de carbono orgánico, para conseguir una menor adsorción de la sustancia al suelo). Las lombrices fueron expuestas a 5 tratamientos de OTC (dosis única de aplicación 0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg /kg suelo p.s.) en el día 0 de inicio del ensayo en suelo agrario [mezcla suelo normal con arena (1:1)]. En el día 21 tras la exposición de OTC, se efectúa un seguimiento de los efectos de la OTC sobre el suelo agrario de ensayo y sobre la lombriz.

Especie empleada en el ensayo

La especie empleada en este ensayo es la lombriz de tierra *Eisenia andrei* (Bouché, 1972; invertebrado terrestre), cuya caracterización genética se realizó mediante un “*Ring test on earthworm barcoding*” descrito por Römcke *et al.* (2014). Los ejemplares de *Eisenia andrei* empleados en este ensayo provienen de un cultivo de crianza de *Eisenia andrei*, realizado según la norma de la OCDE nº 207 (OECD, 1984), que se mantiene en el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) desde el año 1999. El medio de cultivo recomendado para la crianza de la lombriz *Eisenia andrei* es una mezcla 50:50 de estiércol de caballos o ganado vacuno y turba, aunque también se pueden emplear excretas de otros animales. El medio debe ser de pH de aproximadamente 7,0, tener baja conductividad eléctrica (menos de 6,0 miliSiemens/cm) y no estar contaminado excesivamente con amoníaco u orina animal.

Preparación del suelo agrario de ensayo

El suelo empleado en este ensayo es un suelo agrario que procede de la finca “La Canaleja” (Alcalá de Henares, Madrid), y se obtuvo de los 20 primeros centímetros, de una zona no tratada con sustancias químicas, fitosanitarios ni abonos en los últimos 10 años. Posteriormente el suelo fue secado al aire y tamizado (tamaño de partícula ≤ 2 mm), procediendo al mismo tratamiento con la arena lavada de río. Finalmente se procede a la mezcla del suelo y la arena en la proporción 1: 1. La **Tabla 6** presenta sus características fisicoquímicas,

Tabla 6. Características fisicoquímicas del suelo agrario de ensayo empleado*

| Parámetro | Unidad | Valor | Observaciones |
|---|---------|----------------|----------------------|
| Humedad a 105 °C | % | 0,5 | |
| pH al agua susp. 1:2,5 | | 8,3 | Moderadamente básico |
| Conductividad eléctrica a 25 °C (Pr. Pre) | dS/m | 0,21 | No limitante |
| Mat. Orgánica oxidable | % | 1,7 | Medio-bajo |
| Nitrógeno/Nítrico (N-NO ₃) | mg/kg | 17 | Normal-alto |
| Fósforo (P) Asi (Olsen) | mg/kg | 15 | Normal |
| Potasio (K) (Ex. Ac. Am.) | mg/kg | 176 | Normal |
| Magnesio (Mg) [Ex. Ac. Am] | mg/kg | 168 | Normal |
| Carbonato cálcico equiv. | % | 7 | Poco calcáreo |
| Calcio (Ca) [Ex. Ac. Am.] | mg/kg | 4058 | Alto |
| Sodio (Na) [Ex. Ac. Am.] | mg/kg | 50 | Normal |
| Arena total 0,05<D< 2 mm | % | 77,8 | |
| Limo grueso 0,02<D<0,05 mm | % | 8,7 | |
| Limo fino 0,002<D<0,02 mm | % | 5,1 | |
| Clase textural USDA | | FRANCO-ARENOSA | |
| Nitrógeno amoniacal | mg/kg | 3,1 | |
| Nitrógeno Kjeldhal (N) | % | 0,13 | |
| Capacidad intercambio catiónico | meq/100 | 5,1 | |

*Análisis realizado por el Laboratorio de Análisis y Fertilidad de Suelos (LAF). Diputación de Lleida (2008)

Sustancia a ensayo

Nombre común: oxitetraciclina clorhidrato

Fórmula molecular: C₂₂H₂₄N₂O₉ HCl

Peso molecular: 496,90 g/mol

Calidad: 95-100.5 %

Casa comercial: PANREAC (ref. 374948 1606)

Número CAS: 2058-46-0

Número CE: 218-161-2

Contenido en agua: 2%

Preparación de las concentraciones a ensayo

Se preparan 18 kg de la mezcla de suelo-arena (1:1), se distribuyen en 6 sacos de plástico, cada uno con 3 kg de la mezcla suelo-arena.

Se prepara una disolución de 3 g de oxitetraciclina clorhidrato (OTC) en 150 ml de agua Elix, tapándola, con papel de aluminio, para evitar la fotodegradación.

Los 150 ml de disolución de oxitetraciclina se vierten en un saco de plástico que contiene 3 kg de la mezcla suelo-arena (1:1), se homogeneiza y se añaden otros 150 ml de agua Elix, se vuelve a homogenizar, deshaciendo manualmente los agregados que se forman. Esta primera mezcla es el T5 (1000 mg OTC/kg suelo p.s.). Del T5 tomamos 330 g (peso húmedo) y lo vertemos a otro saco de plástico que contiene 2,7 kg de la mezcla suelo-arena (1:1), se homogeniza, se añaden 150 ml de agua Elix y se vuelve a homogenizar, de aquí se obtiene el T4 (100 mg OTC/kg suelo p.s.), se toman 330 g (peso húmedo) y se realiza la misma operación obteniendo los T3, T2 y T1 por diluciones seriadas 1:10.

Finalmente, las concentraciones de oxitetraciclina (OTC) en el medio de ensayo (mezcla suelo agrario y arena 1:1), correspondientes a los distintos grupos de tratamiento, son:

Control

| | | |
|----|---------------|---------------------------|
| T1 | Tratamiento 1 | 0,1 mg OTC/kg suelo p.s. |
| T2 | Tratamiento 2 | 1 mg OTC/kg suelo p.s. |
| T3 | Tratamiento 3 | 10 mg OTC/kg suelo p.s. |
| T4 | Tratamiento 4 | 100 mg OTC/kg suelo p.s. |
| T5 | Tratamiento 5 | 1000 mg OTC/kg suelo p.s. |

De cada grupo de tratamiento, se pesan 3 muestras de suelo agrario de ensayo de 0,83 kg cada una que se introducen en 3 recipientes de ensayo (cristalizadores de vidrio)

Diseño experimental

Condiciones ambientales del ensayo

El ensayo se desarrolla en una cámara climática, en condiciones controladas de luz y temperatura; para la iluminación se emplean fluorescentes de luz blanca fría con un fotoperiodo continuo (24 horas luz) y se mide la iluminancia con un medidor digital de iluminancia (TES 1330) en cada uno de los recipientes del ensayo. Como recipientes de

ensayo se emplean cristalizadores de vidrio (17 cm de diámetro y 7,5 cm de altura). Cada cristalizador contiene 750 g p.s. de mezcla suelo-arena (1:1) y un $8,79\% \pm 0,07$ de contenido en agua (% humedad).

Las condiciones ambientales del ensayo, medidas con un termohigrómetro (Easy Log USB. Lascar Electronics), durante los 21 días a intervalos de 1 hora, fueron temperatura $20,5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; humedad relativa $61,0 \pm 8,2\%$; punto de rocío $12,6 \pm 2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos los recipientes del ensayo se cubren con film plástico, perforado, para evitar la fuga de lombrices y evitar la pérdida de humedad.

Mediciones y determinaciones analíticas

Al inicio (día 0) y al final del ensayo (día 21) se realizan las siguientes medidas:

- Recuento de lombrices y determinación del porcentaje de mortalidad.
- Peso fresco de cada individuo, tras 24 horas de purga en oscuridad, y pérdida de peso.
- Contenido de humedad del suelo agrario (%) (diferencia entre el peso del suelo agrario de ensayo y el peso tras desecación en estufa a 105°C)
- pH y conductividad eléctrica de la mezcla suelo:arena (1:1) en solución mezcla:agua (1:2,5)
- Iluminancia (lux) de cada recipiente de ensayo se mide los días 0 y 7 del ensayo con un medidor digital de iluminancia (TES 1330).

El día 7 de ensayo se procede a la apertura de los cristalizadores, al recuento de lombrices y a reponer la humedad perdida por adición de 40 ml de agua Elix a cada envase de ensayo (cristalizador).

Procedimiento

En cada recipiente de ensayo (cristalizador), conteniendo 830 g de suelo agrario de ensayo tratado con OTC (5 tratamientos, dosis de aplicación única: 0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg OTC/kg de suelo p.s.), se introducen 10 individuos maduros (edad igual o superior a 2 meses, con clitelo) de la especie de lombriz *Eisenia andrei* (Annelida, Lumbricidae) (OECD, 1984). Todos los recipientes del ensayo se distribuyen de manera aleatoria en una cámara climática con condiciones de luz (fotoperiodo) y temperatura controladas.

Los parámetros a determinar son:

- Peso fresco de cada individuo al inicio (día 0) y al final (día 21) del ensayo y determinación de la pérdida de peso entre el día inicial (día 0) y final (día 21) del ensayo.
- Mortalidad (*versus* supervivencia) al final del ensayo (día 21)

Determinación del peso fresco de las lombrices *Eisenia andrei*

24 horas antes del inicio del ensayo, se escogen individuos maduros (con clitelo) de lombriz *Eisenia andrei*, se distribuyen en lotes de 10 individuos que se introducen en placas de Petri, con papel de filtro humedecido con 2 ml de agua Milli-Q, manteniéndose en oscuridad durante 24 horas; esto favorece la purga de la lombriz, es decir, la eliminación de restos de suelo contenidos en su tracto digestivo.

Validez del ensayo de toxicidad aguda en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Para que el ensayo pueda considerarse valido, debe cumplirse que, la mortalidad en los controles no exceda el 10% al final del ensayo.

2.1.3. Ensayo en un sistema multi-especie en suelo

Los sistemas multi-especie en suelo (MS3: Multi Species Soil Systems), en adelante sistemas MS3, son microcosmos terrestres que permiten valorar, de forma simultánea, los efectos de los contaminantes sobre los tres grupos taxonómicos representativos del compartimento suelo (microorganismos, plantas e invertebrados terrestres). El diseño de los sistemas MS3 ha sido descrito en distintas publicaciones científicas (Carbonell *et al.* 1998; Fernández C. *et al.* 2004, Fernández M.D. *et al.*, 2005; Boleas *et al.* 2005a, b). El sistema MS3 utilizado en el presente estudio es un sistema multiespecie en suelo (**Figura 19**). Corresponde con tubos de policloruro de vinilo (PVC) de alta presión, de 200 mm de diámetro x 300 mm de altura, 314,16 cm² de superficie y un volumen de 9.420 cm³, que se cierran en su parte inferior con un sistema de contención permeable (tejido de voile sostenido por una malla de fibra de vidrio) unido al tubo con una abrazadera Super; una vez rellenos los tubos con el suelo; este sistema evita la pérdida del suelo y permite la percolación-lixiviación del agua empleada en el riego. En la parte superior del tubo se colocan 2 cintas perforadas, unidas al tubo mediante otra abrazadera Super, que acaban cada una en 1 gancho S, lo que permite colgar los sistemas de una estantería metálica que lleva incorporados 4 tubos fluorescentes (Philips TLD 18W/54) y 8 reflectores (Neodyme-Laes V.E27 40W) conectados a un temporizador que permite establecer un ciclo de horas luz / oscuridad. A estos sistemas

se les incorpora, en la parte inferior, un embudo y una botella de cristal opaco y boca ancha, que nos permite la recolección de lixiviados. Este sistema nos permite simular un suelo agrario de 20 cm de profundidad así como la recogida de los lixiviados producidos por percolación del agua empleada en el riego de estos sistemas durante los 21 días de duración del ensayo. En cada sistema MS3 se introducen 8 kg p.s. suelo agrario de ensayo, previamente secado al aire y tamizado (tamaño de partícula ≤ 2 mm), de clase textural franco-arenosa, que nos provee de poblaciones microbianas naturales del suelo original. Una vez rellenos, los sistemas MS3, con el suelo agrario de ensayo se procede a la siembra de 30 semillas de plantas terrestres de las siguientes especies: 10 semillas de *Triticum aestivum* (trigo), 10 semillas de *Brassica napus* (colza) y 10 semillas de *Vicia sativa* (veza) (**Figura 19**). Posteriormente a la siembra de las semillas, se incorporan a cada uno de los sistemas MS3 lotes homogéneos de 10 individuos de la lombriz de tierra *Eisenia andrei* previamente seleccionados, purgados y pesados.

Los sistemas MS3 son expuestos, durante 21 días, a distintas concentraciones de oxitetraciclina (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3), adicionadas al suelo en disolución líquida (mediante un riego) al inicio del ensayo, frente a un grupo testigo o control (no expuesto a oxitetraciclina). El ensayo se lleva a cabo en una cámara climática, en condiciones controladas de luz y temperatura. Las especies vegetales, animales y microorganismos del suelo empleadas en este ensayo son ecológicamente relevantes y son indicativos de la existencia de un daño en un sistema biológico.



Matriz: sistema multi-especie en suelo (MS3): tubo de PVC de 20 cm de altura por 20 cm de diámetro relleno con 8 kg de suelo de ensayo agrario biológicamente activo, conectado a un sistema colector de lixiviado.

Suelo agrario de ensayo: mezcla de suelo natural agrario tamizado (2 mm) con arena lavada de río tamizada (2 mm) en proporción 1:1-

Producto químico a ensayo: oxitetraciclina, aplicada mediante riego superficial al inicio del ensayo (día 0), 4 tratamientos, dosis de aplicación única: 864; 86,4, 8,64; 0,864 mg OTC/sistema MS3-

Organismos a ensayo: el suelo agrario nos provee de poblaciones microbianas. Se siembran 3 variedades de plantas y se introducen lombrices adultas el día de inicio del ensayo-

Simulaciones climáticas: el sistema multi-especie en suelo se mantiene a temperatura controlada ($23,5 \pm 1,6$ °C), humedad relativa ($45,2 \pm 6,7$ %), fotoperiodo (16 horas luz/8 horas oscuridad) y riegos diarios de 4,88 l/m² con agua Elix (desionizada)

Figura 19. Sistema multi-especie en suelo (MS3) diseñado para la evaluación de efectos de compuestos químicos sobre suelo agrario.

Especies empleadas en el ensayo

(1) Especies vegetales: las semillas de las especies vegetales empleadas en este ensayo nos fueron provistas por el Centro de Evaluación de Variedades de Madrid, perteneciente a la Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Productos Fitosanitarios (DTEVPF), y son las siguientes:

- ***Brassica napus*** (colza invierno) ES HIDROMIEL [Colza, dicotiledónea, Brassicaceae, Cruciferae]
- ***Vicia sativa*** (veza) VEZA NIKIAN [Veza, dicotiledónea, Fabaceae, Leguminosae]
- ***Triticum aestivum durum*** (trigo duro) YECA [Trigo, monocotiledónea, Poaceae, Gramineae]

(2) Invertebrados terrestres: la especie empleada es la lombriz de tierra *Eisenia andrei*, que procede de un cultivo de crianza mantenido en el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

(3) Microorganismos del suelo (se determina la producción de CO₂ y la actividad enzimática deshidrogenasa derivada de las potenciales poblaciones presentes en el suelo)

Preparación del suelo agrario de ensayo

El suelo empleado en este ensayo es un suelo agrario que procede de la finca “La Canaleja” (Alcalá de Henares, Madrid), y se obtuvo de los 20 primeros centímetros, de una zona no tratada con sustancias químicas, fitosanitarios ni abonos en los últimos 10 años. Posteriormente el suelo fue secado al aire y tamizado (tamaño de partícula ≤ 2 mm), procediendo al mismo tratamiento con la arena lavada de río. Finalmente se procede a la mezcla del suelo y la arena en la proporción 1: 1. El motivo por el que el este suelo agrario se mezcla con arena se debe, en primer lugar, a que este suelo es demasiado arcilloso y en segundo lugar para simular el “peor caso posible”, es decir, conseguir un suelo con alto porcentaje de arena y un bajo contenido en carbono orgánico, para conseguir una menor adsorción de la oxitetraciclina al suelo y por tanto, desde el punto de vista teórico, una mayor movilidad de la sustancia a ensayo. La densidad aparente de la mezcla suelo-arena (1:1) es de 1,3 g/cm³. El peso de los primeros 5 cm de la mezcla suelo-arena (1:1), de un sistema MS3, es de 2.042,04 g p.s.

La **Tabla 6** presenta las características fisicoquímicas del suelo. El suelo se define como una mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado, habitados por macro- y micro-organismos. El suelo puede manipularse en dos estados:

a) *no perturbado*, tal como se ha desarrollado en el tiempo, en capas características de diversos tipos de suelo,

b) *perturbado*, como suele encontrarse en los campos cultivables o como se presenta cuando se toman muestras extraídas del suelo. (Directiva 2004/73/CE)

Sustancia a ensayo

Nombre común: oxitetraciclina clorhidrato

Fórmula molecular: $C_{22}H_{24}N_2O_9$ HCl

Peso molecular: 496,90 g/mol

Calidad: 95-100.5 %

Casa comercial: PANREAC (ref. 374948 1606)

Número CAS: 2058-46-0

Número CE: 218-161-2

Contenido en agua: 2%

Preparación de las concentraciones a ensayo

Se prepara una disolución de 2,88 g/l de oxitetraciclina clorhidrato (OTC) en agua Elix y por diluciones seriadas 1:10, llevadas a 1 litro con agua Elix, se preparan las concentraciones de oxitetraciclina, que contienen: 0,288; 0,0288; 0,00288 y 0,000288 g OTC/l agua.

Modo de aplicación

De cada una de las concentraciones preparadas se emplean 300 ml, por sistema MS3, para ser aplicados al suelo mediante un riego en superficie.

Resultando 4 tratamientos de OTC, con una dosis de aplicación única de: 0,8; 8,6; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3. En la **Tabla 7** se reflejan los distintos tratamientos de OTC y sus dosis de aplicación equivalentes, expresadas en mg/cm^2 o kg/ha.

Tabla 7. Dosis de oxitetraciclina (OTC), aplicación única (4 tratamientos: 0,864; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) mediante un riego superficial al inicio del ensayo con sistema multi-especie en suelo (MS3) y dosis de aplicación equivalentes

| Tratamiento | Oxitetraciclina (OTC) | | | | |
|----------------|-----------------------|--------------------|--------|-------|------|
| | mg/MS3 | mg/cm ² | | kg/ha | |
| Control | | | | | |
| T1 | 0,864 | ≈ | 0,0027 | ≈ | 0,28 |
| T2 | 8,64 | ≈ | 0,027 | ≈ | 2,75 |
| T3 | 86,4 | ≈ | 0,27 | ≈ | 27,5 |
| T4 | 864 | ≈ | 2,7 | ≈ | 275 |

Diseño experimental

Se realiza un ensayo de exposición, de 21 días de duración, a distintas concentraciones de oxitetraciclina, aplicadas mediante un solo riego, al inicio del ensayo, en la superficie de cada sistema MS3, con 300 ml de disolución acuosa que contenían 4 tratamientos: 0,864; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3.

Para el desarrollo de este ensayo se emplean 15 sistemas MS3 con 8 kg suelo p.s., cada uno, de suelo agrario de ensayo, de clase textural franco-arenosa. En cada sistema MS3 se siembran 10 semillas de *Triticum aestivum* (trigo), 10 semillas de *Brassica napus* (colza), 10 semillas de *Vicia sativa* (veza o alverja) y se introducen 10 individuos de lombriz de tierra (*Eisenia andrei*), previamente pesados para conseguir lotes homogéneos por grupo de tratamiento.

Condiciones ambientales del ensayo

El ensayo se realiza en una cámara climática, en condiciones controladas de luz y temperatura, se establece un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, para la iluminación se emplearon fluorescentes de luz blanca fría (SYLVANIA Standard F18W/154-T8 daylight) y reflectores (Neodyme-Laes V.E27 40W) y los sistemas MS3 se distribuyen de manera aleatoria.

24 horas antes del inicio del ensayo, el suelo de cada sistema MS3 se activa, mediante un riego, con 320 ml de agua Elix, por sistema MS3.

Cada sistema MS3 se riega simulando una pluviosidad promedio diaria de $4,88 \text{ l/m}^2$ (por sistema MS3), equivalente a una pluviometría anual de $\approx 1.781 \text{ l/m}^2$, con lo que establecemos el peor caso posible en cuanto a pluviometría, que, teóricamente, permitiría una mayor movilidad a través del suelo. El tipo de agua empleado en el riego es agua Elix, para evitar posibles interferencias debidas a interacciones con cualquier componente del agua natural. La cantidad total de agua Elix empleada fue de 3.220 ml por sistema MS3.

Las condiciones ambientales del ensayo, medidas con un termohigrómetro (Easy Log USB. Lascar Electronics), durante los 21 días a intervalos de 1 hora, fueron temperatura $23,5 \pm 1,6 \text{ }^\circ\text{C}$; humedad relativa $45,2 \pm 6,7\%$; punto de rocío $10,8 \pm 3,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pauta de riego

El día anterior al día de inicio del ensayo, se activa cada sistema con 320 ml de agua Elix, el día de inicio (día 0), antes de la aplicación de las distintas concentraciones de OTC, y para favorecer la introducción de las lombrices en el suelo, se regaron los sistemas MS3 con 100 ml de agua Elix. A continuación se regó cada grupo de tratamiento con sus respectivas concentraciones de OTC. La pauta siguiente fue regar a diario con 100 ml de agua Elix excepto los días 2, 5 y 9 en que se regó con 200 ml cada sistema. Del día 12 al 16, para forzar la lixiviación de los sistemas MS3 se regó con 300 ml de agua Elix; produciéndose la lixiviación el día 15 del ensayo. Del día 16 hasta el día 21 no se regaron los sistemas MS3 (**Tabla 8**).

Tabla 8. Pauta de riego con agua Elix, de los sistemas MS3

| Día | | Agua Elix (ml) | Soluciones acuosas (ml) conteniendo distintas concentraciones de OTC |
|-----|----|----------------|--|
| L | -2 | | 0 |
| M | -1 | 320 | 0 |
| X | 0 | 100 | 300 |
| J | 1 | 100 | 0 |
| V | 2 | 200 | 0 |
| S | 3 | | |
| D | 4 | | |
| L | 5 | 200 | 0 |
| M | 6 | 100 | 0 |
| X | 7 | 100 | 0 |
| J | 8 | 100 | 0 |
| V | 9 | 200 | 0 |
| S | 10 | | |
| D | 11 | | |
| L | 12 | 300 | 0 |
| M | 13 | 300 | 0 |
| X | 14 | 300 | 0 |
| J | 15 | 300 | 0 |
| V | 16 | 300 | 0 |
| S | 17 | | |
| D | 18 | | |
| L | 19 | | |
| M | 20 | | |
| X | 21 | | |

Mediciones y determinaciones analíticas

Durante todo el ensayo se emplea un registrador de datos de humedad, temperatura y punto de rocío (EL-USB-2, Lascar Electronics), que realiza mediciones a intervalos de una hora.

Al final del ensayo (21 días):

- El contenido de humedad del suelo.

- La iluminancia con un medidor digital de iluminancia (TES-1330 Digital Light Meter TES Electrical Electronic Corp.)

Se valoran los efectos, en organismos terrestres, mediante la determinación de los siguientes parámetros, en:

- Plantas terrestres (*Triticum aestivum*, *Brassica napus* y *Vicia sativa*): germinación, longitud del tallo y peso fresco.
- Microorganismos del suelo: producción de CO₂
- Invertebrados terrestres (*Eisenia andrei*): mortalidad (*versus* supervivencia) y peso fresco

Se realiza un análisis químico de las concentraciones de oxitetraciclina, por HPLC-PDA, en los 5 primeros centímetros del suelo y por HPLC-MS en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*.

Apertura y toma de muestras de los sistemas MS3

A los 21 días de exposición se procede a la apertura de los sistemas MS3 y a los siguientes procedimientos:

Plantas: En primer lugar se procede al recuento y anotación del número de plantas viables de cada especie sembrada en cada sistema MS3, seguidamente se corta la parte aérea y se recogen en carpetas de papel de laboratorio para posteriormente medir la longitud y el peso fresco de cada planta.

Suelo: A continuación se toman muestras de suelo del perfil superior (5 primeros cm) de cada sistema MS3 para la determinación del contenido de humedad, la determinación de la producción de CO₂ y, la actividad enzimática del suelo.

Lombrices: Se desmonta cada sistema MS3 y se procede al recuento de lombrices que posteriormente serán purgadas durante 24 horas, en placa Petri con papel de filtro humedecido, pesadas individualmente y guardadas (en congelación) para analizar el contenido de OTC por lote.

2.1.3.1. Determinación del contenido de humedad, producción de CO₂ y actividad enzimática del suelo

El contenido de humedad del suelo (g de agua por 100 g de suelo), es una variable de gran importancia para la actividad de los microorganismos del suelo y para funciones de los microorganismos asociadas a los ciclos de nutrientes (ciclo del carbono). El suelo no deberá estar ni demasiado húmedo ni demasiado seco para mantener una aireación y nutrición adecuadas de la microflora edáfica. El contenido de humedad recomendado para un crecimiento microbiano óptimo se sitúa entre 40-60% de capacidad de retención de agua (Directiva 2004/73/CE).

Método gravimétrico para la determinación del contenido de humedad del suelo

Se pesan de 5 a 10 g de muestra de suelo, con aproximación de 0,001 g, secar en estufa a 105°C hasta peso constante pesando de nuevo. El contenido de humedad, expresado en porcentaje de agua contenido por el suelo se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\% agua)} = 100 - (P_S \times 100) / P_H$$

siendo

P_H = peso, en gramos, de la muestra de suelo y

P_S = peso, en gramos, de muestra de suelo desecada.

Con respecto a la producción de CO₂ en el suelo, se valora la transformación del carbono, que es la degradación por microorganismos de la materia orgánica hasta formar dióxido de carbono como producto final (Directiva 2004/73/CE, OECD 2000). El experimento consiste en mezclar las muestras obtenidas, de los suelos tratados y no tratados (control), con glucosa y medir las tasas de respiración inducidas por la glucosa (es decir, la medida de las cantidades de dióxido de carbono formado) durante 24 horas consecutivas. Las tasas de respiración se expresan como dióxido de carbono liberado (mg dióxido de carbono/100 g suelo p.s./hora). Finalmente se comparan las tasas de respiración en las muestras de suelo tratado con las muestras no tratadas del grupo control y se calcula el porcentaje de desviación con respecto a los controles.

Para medir la producción de dióxido de carbono empleamos un aparato de incubación con registrador de la variación de la impedancia (BacTrac 4300 SY-LAB, GmbH, P.O. Box 47 A-3002 Purkersdorf, Austria). La medida está basada en la disminución de la impedancia que produce una mezcla de suelo a la que se adiciona una mezcla de glucosa /

talco (10:1) sobre una disolución acuosa de KOH 0,2% (p/v) al ser incubada 24 horas a una temperatura de 22°C. La disminución de la impedancia implica un aumento de la conductividad por producción de CO_3K_2 ($\text{KOH} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Luego ajustando los valores a los pesos secos y comparando con curvas patrón determinamos la cantidad de carbono que se ha producido.

Procedimiento

A la finalización del ensayo (21 días) se toman 20 g de muestra de la mezcla suelo-arena (1:1) de cada sistema MS3; las muestras se mezclan con 100 mg de una mezcla de glucosa-talco (10:1). Una vez bien homogeneizada la mezcla, de cada muestra se toman 3 submuestras de 2 g cada una y se introducen en viales de plástico de 4 x 1,5 cm; estos viales se introducen a su vez en las células de medida que contienen 2 ml de una disolución de KOH al 0,2 % recién preparada con agua Milli-Q; el conjunto (célula de medida con el vial) se cierra herméticamente y se introduce en la cámara de medida termostatizada a 22 °C que a intervalos regulares de 10 minutos mide la variación de impedancia en cada una de las células de medida y se determina la tasa de producción de CO_2 mediante una curva previa de calibración. Para la estimación de la tasa se toman tres puntos de la curva coincidentes con una variación del 60, 70 y 80% de la impedancia inicial. Las tasas de respiración determinadas se corrigen de acuerdo al contenido de humedad de la muestra para expresar el resultado como mg CO_2 producido/100g de suelo p.s./hora.

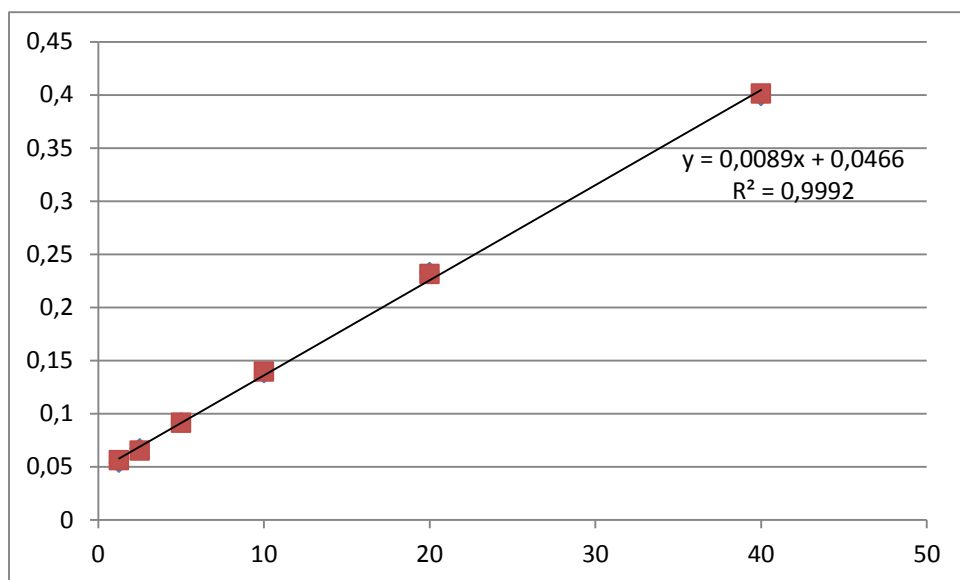
Actividad enzimática deshidrogenasa

Las deshidrogenasas son enzimas que pertenecen al grupo de las óxido-reductasas. Catalizan la oxidación de sustratos produciendo electrones que pueden entrar en el sistema de transporte de electrones celular. Colorantes específicos, como el 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro, interceptan el flujo de electrones y se utilizan como indicador de la actividad del sistema de transporte de electrones. Durante un periodo de incubación de 24 horas a 27 °C, se produce un precipitado rojo de 1,3,5-trifenilformazan, que se cuantifica midiendo la absorbancia producida a una longitud de onda de 485 nm (Rogers y Li, 1985). Los efectos, que las distintas concentraciones de OTC puedan producir sobre los microorganismos del suelo, se valoran mediante la cuantificación del 1,3,5-trifenilformazan producido (precipitado rojo). La actividad de la enzima se mide valorando la producción de 1,3,5-trifenilformazan utilizando como sustrato el 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro.

Procedimiento

En un tubo de 10 ml de capacidad, se añaden 5 mg de alfalfa deshidratada en polvo (como fuente de carbono) por gramo de suelo, a continuación se pesa 1 gramo de muestra, se añade 0,5 ml de glucosa al 0,5% en agua y 0,2 ml de 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro al 3%, se agita, en agitador tipo vórtex y se lleva a una estufa para incubar a 27 °C, en oscuridad, durante 24h. Transcurrido ese tiempo, se sacan las muestras de la estufa, se añaden 2,5 ml de metanol para detener la reacción, se vuelven a agitar, en agitador tipo vórtex y se centrifugan a 3500 rpm durante 4 minutos. Se recoge el sobrenadante y se toman volúmenes de 200 µl de cada muestra, por duplicado, que se llevan a una placa de 96 pocillos, midiéndose a continuación la absorbancia en un lector de placas multipocillos (espectrofluorímetro Genios TECAN), a una longitud de onda de 485 nm frente a metanol. Los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras de suelo, se interpolan en la recta de regresión obtenida de una curva de calibración de 40 a 2 µg/ml de 1,3,5-trifenilformazan. Los resultados finales se corrigen en función del contenido de humedad de la muestra y se expresan como µg de 1,3,5-trifenilformazan/g de suelo seco/día.

Curva de calibración para la actividad enzimática deshidrogenasa



2.1.3.2. Estudio de la germinación y crecimiento en plántulas terrestres mono- y dicotiledóneas (*Triticum aestivum*, *Brassica napus*, *Vicia sativa*)

El estudio, basado en la guía de la OECD n° 208 (OECD, 2006c), está diseñado para evaluar los efectos sobre la germinación y el crecimiento inicial en plántulas de plantas superiores terrestres tras la exposición a distintas concentraciones de oxitetraciclina aplicadas, mediante riego, en la superficie del suelo. Consiste en la siembra de 30 semillas (10 semillas por especie), de cada una de 3 especies de plantas terrestres empleadas (trigo, colza y veza), en el suelo agrario de ensayo de los sistemas MS3, expuestos a las concentraciones de OTC y posterior evaluación de los efectos que se produzcan en los 21 días de duración del ensayo.

Los puntos finales medidos son la evaluación visual de la germinación de las plántulas, la determinación del peso fresco y la longitud del tallo y los efectos negativos visibles en diferentes partes de la planta (clorosis, necrosis, marchitez, deformaciones de las hojas).

Las variedades vegetales empleadas son:

Triticum aestivum (trigo, Familia Gramineae [Poaceae], monocotiledónea,),

Brassica napus (colza, Familia Cruciferae [Brassicaceae], dicotiledónea) y

Vicia sativa (veza, Familia Leguminosae [Fabaceae], dicotiledónea)

Los parámetros que se determinan a la finalización del ensayo (día 21), son;

- Germinadas
- Longitud del tallo
- Peso fresco

Se utiliza un análisis estadístico apropiado para obtener una concentración efectiva (EC_x) para el parámetro(s) más sensible de interés. Además, en este ensayo, se pueden calcular la concentración sin efecto observado (NOEC) y la concentración más baja para la que se observa un efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo frente al grupo control.

Validez del ensayo

Para que el ensayo pueda considerarse valido, deben cumplirse los siguientes criterios en los controles:

- La emergencia de las plántulas debe ser como mínimo del 70%

- Las plántulas no deben mostrar efectos fitotóxicos (por ejemplo, clorosis, necrosis, marchitez y deformaciones de las hojas)
- El porcentaje de plantas supervivientes en los grupos control debe ser, al final del ensayo, como mínimo el 90%.

2.1.3.3. Estudio de la mortalidad y biomasa en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

El método empleado es una modificación del ensayo de toxicidad aguda para lombriz de tierra de la OECD n° 207 (OECD, 1984). La modificación de este ensayo con respecto a la guía de la OECD n° 207 ha consistido en incrementar el tiempo de exposición de 14 a 21 días, y también el suelo artificial ha sido sustituido por un suelo agrario al que se le adiciona arena lavada de río en proporción 1:1 para simular el “peor caso posible” (un alto porcentaje de arena y un bajo porcentaje de carbono orgánico, para conseguir una menor adsorción de la sustancia al suelo).

Como parámetro final, además de la mortalidad, único parámetro contemplado en la guía de la OECD n° 207, también se ha considerado la variación en el peso fresco al final del ensayo.

Se realiza un estudio de toxicidad en la lombriz de tierra, *Eisenia andrei* en los sistemas MS3 expuestos, durante 21 días, a distintos tratamientos con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3)

Al inicio del ensayo (día 0) se introducen 10 individuos maduros (edad igual o superior a 2 meses, con clitelo) de la especie *Eisenia andrei* (Annelida, Lumbricidae) en cada uno de los sistemas MS3. 24 horas antes del inicio del ensayo, se escogen de un cultivo individuos maduros (con clitelo) de *Eisenia andrei*, son lavados con agua Elix y posteriormente se distribuyen en lotes de 10 individuos, que son introducidos en placas de Petri con un papel de filtro humedecido con 2 ml de agua Milli-Q, manteniéndose en oscuridad 24 horas; de este modo se purga la lombriz de restos de suelo contenidos en su tracto digestivo. Pasadas las 24 horas, las lombrices, previamente secadas del contenido en humedad en papel de filtro de laboratorio, son pesadas individualmente en balanza analítica de precisión. Por último, con el peso fresco (p.f.) obtenido, se equilibran los lotes mediante la realización de un análisis de la varianza (ANOVA), realizado con el programa estadístico STATGRAPHICS® Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp.), que mediante la comparación de los valores medios para cada lote nos permite, comprobar la homogeneidad de cada lote con respecto a todos los demás

lotes empleados, asegurando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre lotes, consiguiendo así lotes homogéneos, por grupo de tratamiento, al inicio del ensayo.

Al final del ensayo (día 21), tras la obtención y recuento de los individuos de cada sistema MS3, se procede a su lavado con agua Elix, se introducen en placas de Petri con papel humedecido con 2 ml de agua Elix y se mantienen en oscuridad 24 horas, facilitando su purga; pasadas las 24 horas, se procede al secado en papel de filtro y a su pesaje individual, introduciendo los especímenes en tubos de 50 ml, fondo cónico y tapón de rosca para proceder a su conservación en congelación (-45°C) hasta la realización del análisis por HPLC para determinar la concentración de OTC.

En las lombrices, los parámetros que se determinan al final del ensayo (día 21) son:

- Peso fresco y pérdida de peso (por diferencia de peso con el día 0 del ensayo)
- Mortalidad (versus supervivencia)

Estimación EC_x / NOEC / LOEC

El peso fresco de las lombrices expuestas a las distintas concentraciones de OTC en el suelo se compara con el peso fresco del grupo control con el fin de determinar, mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA), la concentración más baja para la que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control (LOEC) y la concentración para la que no se observa ningún efecto estadísticamente significativo con respecto al grupo control (NOEC). Solo en el caso de existir efectos estadísticamente significativos se podría calcular la EC_x mediante el uso de un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría un x% de reducción en el peso.

Validez del ensayo de toxicidad aguda en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Para que el ensayo pueda considerarse válido, debe cumplirse que, la mortalidad en los controles no exceda el 10% al final del ensayo.

2.2. Método analítico de oxitetraciclina

2.2.1. Análisis de oxitetraciclina en el medio de crecimiento de la planta acuática *Lemna minor*

Procedimiento de extracción

Se toman 2 ml de medio de crecimiento SIS (Swedish Standard), de cada envase del ensayo, a las 0, 1, 2, 3, 4, y 7 días. Las muestras a analizar se filtran por 0,45 μm (nylon), se diluyen con la fase móvil de HPLC (1 ml de muestra más 0,5 ml de fase móvil) y se inyectan 20 μl directamente en el cromatógrafo. No fue necesario el almacenamiento de las muestras ya que los análisis fueron realizados inmediatamente después de la toma de muestras.

Condiciones cromatográficas

El cromatógrafo utilizado fue un equipo de HPLC modelo Waters HPLC, con un módulo de separación (Waters 2695) y un detector UV/VIS fotodiodo array (Waters 2896). La columna empleada fue una columna Luna C18(2) [5 μm 150 x 3,6 mm] (Phenomenex). La temperatura de la columna fue de 40 °C. El flujo de la bomba se fijó en 1 ml/minuto. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo:ácido oxálico 0,01 M (15:85). La longitud de onda del detector fotodiodo array fue de 354 nm y el volumen de inyección de la muestra fue de 20 μl . Bajo estas condiciones, la OTC presenta un tiempo de retención de 7 minutos. Para la cuantificación de la OTC presente en las muestras se utilizó el método del estándar externo. La solución stock (1 mg OTC/ml) y las soluciones de trabajo de OTC se prepararon diariamente en fase móvil [acetonitrilo:ácido oxálico 0,01 M (15:85)]. Previamente a cada tanda de análisis de muestras se preparó una curva de calibración. Las curvas de calibrado para la OTC fueron lineales en un rango de 0,04 – 10 $\mu\text{g/ml}$, con unos coeficientes de correlación R^2 de 0,9996 – 1 (**Figura 20**). La recuperación media de OTC en el medio de crecimiento SIS fue >90%. La precisión intra-día e inter-día presentó un coeficiente de variación <5%. No existió ninguna interferencia con los compuestos del medio de crecimiento lo que evidencia la especificidad del método. El límite cuantificación (LOQ) fue de 0,04 $\mu\text{g/ml}$. El método utilizado fue específico para la sustancia analizada OTC, y no se observó en el cromatograma ninguna interferencia con los compuestos del medio (**Figura 21**).

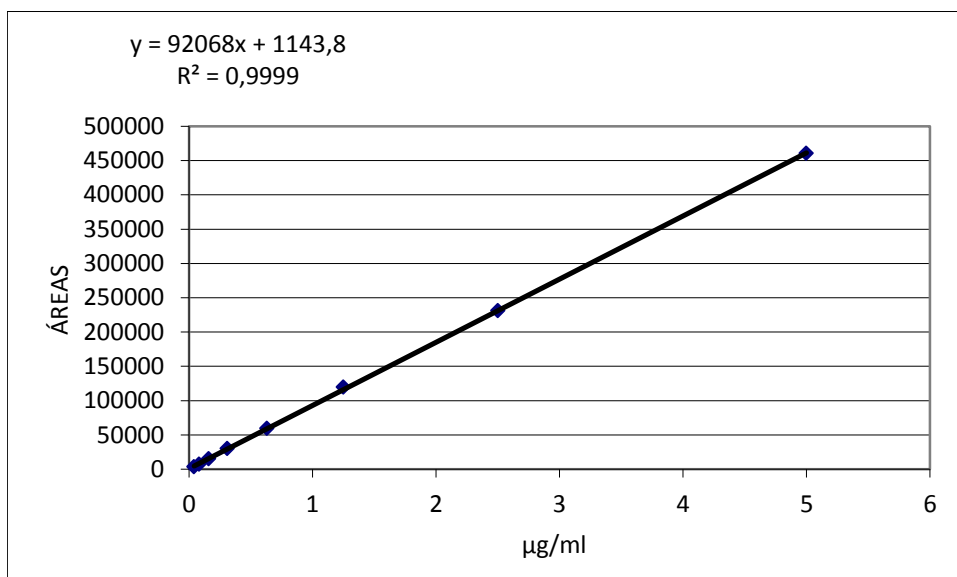


Figura 20. Recta de calibrado de OTC para el análisis en el medio de ensayo SIS

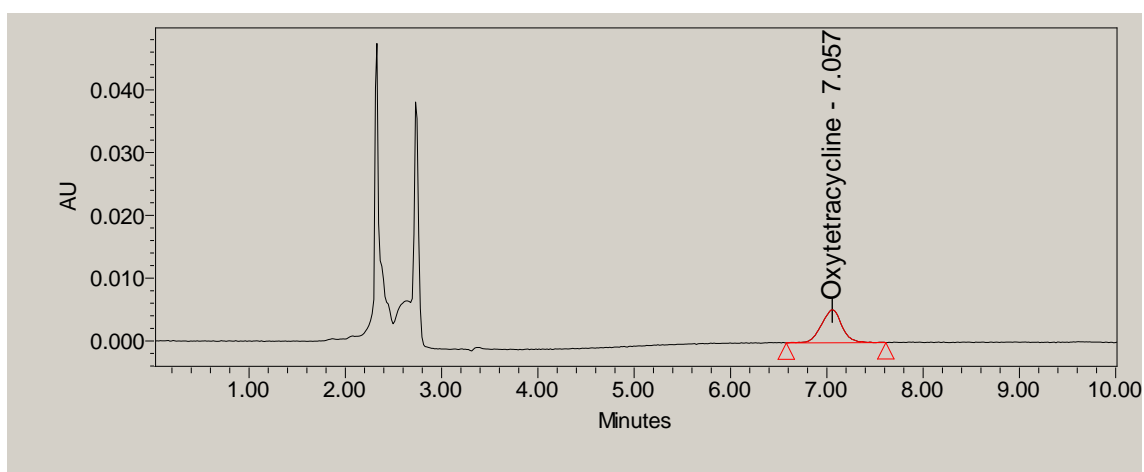


Figura 21. Cromatograma correspondiente a una muestra fortificada, 4 µg OTC/ml, en el medio de ensayo SIS

2.2.2. Análisis de oxitetraciclina en el suelo

Procedimiento de extracción

El método se basa en el procedimiento descrito por Blackwell *et al.* (2004a, b).

En el suelo, la extracción de OTC se realiza mediante el empleo de un baño de ultrasonidos (Ultrasonic LC 130H) y la posterior limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida (SPE: Solid Phase Extraction) con dos cartuchos en tándem HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) y SAX (Strong Anion Exchange).

Extracción de OTC en muestras de suelo

Se pesan 4 g de suelo en tubo de centrifuga de 12 ml de capacidad, se añaden 5 ml de una mezcla de metanol:buffer de extracción (50:50), se agita, en agitador tipo vórtex, durante 30 segundos y a continuación se introducen en baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Después de centrifugar a 4200 rpm durante 15 minutos (centrífuga UNIVERSAL 16, Hettich), el sobrenadante obtenido se vierte en una botella de vidrio conteniendo 400 ml de agua Milli-Q. Se repite la extracción otras dos veces, vertiendo los extractos a la misma botella. Tras añadir 200 µl de H₃PO₄ para reducir el pH (2,9) se procede a continuación a la extracción en fase sólida (SPE).

Purificación de los extractos en fase sólida (SPE)

Se utilizan cartuchos SAX (Strata SAX, Phenomenex 8B-S008-FBJ) y cartuchos HLB (Strata-XL Phenomenex 8B-S043-FCH), que se acondicionan con 2,5 ml de metanol, 2 veces, y 2,5 ml de buffer de acondicionamiento, 2 veces; después se filtra la muestra (extracto de suelo diluido) a una velocidad inferior a 10 ml/min. Se retira el cartucho SAX y se lava el cartucho HLB con 5 ml de buffer de acondicionamiento, 2,5 ml de 0,1 M sodio acetato hidratado, 5 ml de agua Milli-Q y 2 ml de metanol al 20%. Los cartuchos se secan durante 10 minutos al vacío y se eluyen con 2 ml de metanol, 3 veces. Los eluatos se evaporan a sequedad (Genevac 40 °C) y se redisuelven en 2 ml de la fase móvil de HPLC. Si fuera necesario, se filtran por 0,45 µm (nylon) antes de inyectarse en el cromatógrafo.

Dependiendo del tipo de suelo al finalizar el proceso de extracción puede seguir obteniéndose un extracto de color amarillo que interfiere con la detección de la OTC a 357 nm; en estos casos a ese extracto se le añaden 100 mg de PSA Bonded Silica, se agita durante 2 minutos, en agitador tipo vórtex a 1400 rpm, a continuación se centrifuga a 2500 rpm durante 3 minutos y se inyecta en el cromatógrafo el sobrenadante. Esta técnica se denomina

dispersión en fase sólida dSPE (dispersive Solid Phase Extraction) con PSA (Primary Secondary Amine);

Preparación de soluciones

- Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica, dihidrato (EDTA) 0,1 M: Disolver 18,6 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Ácido cítrico monohidrato 0,2 M: Disolver 21,0 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Di-sodio hidrógeno fosfato 12 hidrato 0,4 M: Disolver 71,628 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Buffer McIlvaine pH 7: 90 ml de ácido cítrico monohidrato 0,2 M, 60 ml de di-sodio hidrógeno fosfato 12 hidrato 0,4 M y ajustar a pH 7 con ácido orto-fosfórico o sodio hidróxido.
- Buffer de extracción: Mezclar 150 ml de EDTA 0,1 M con 150 ml de Buffer McIlvaine
- Ácido oxálico dihidrato 0,01 M: Disolver 1,26 g en 1 L con agua Milli-Q
- Buffer de acondicionamiento: Diluir 20 veces el Buffer de extracción
- Sodio acetato 3 hidrato 0,1 M: Disolver 1,36 g en 100 ml de agua Milli-Q.

Condiciones cromatográficas

El cromatógrafo utilizado fue un equipo de HPLC modelo Waters HPLC, con un módulo de separación (Waters 2695) con un detector UV/VIS fotodiodo array (Waters 2896). La columna empleada fue una columna Luna C18(2) [5 µm 150 x 3,6 mm] (Phenomenex). La temperatura de la columna fue de 40 °C. El flujo se fijó en 1 ml/minuto. La fase móvil consistió en un gradiente de tres disolventes, metanol (A), ácido oxálico 0,01 M (B) y acetonitrilo (C) de acuerdo al siguiente programa:

| Tiempo (minutos) | % A | % B | % C |
|-----------------------------|------------|------------|------------|
| 0 | 5,0 | 92,5 | 2,5 |
| 15 | 5,0 | 20,0 | 75,0 |
| 18 | 5,0 | 92,5 | 2,5 |
| 25 | 5,0 | 92,5 | 2,5 |

La longitud de onda del detector fotodiodo array fue de 357 nm y el volumen de inyección de la muestra fue de 20 µl. Bajo estas condiciones la OTC presenta un tiempo de retención de 9,8 minutos. Para la cuantificación de la OTC presente en las muestras se utilizó el método del estándar externo. La solución stock (2 mg OTC/ml) y las soluciones de trabajo de OTC se prepararon en metanol. Previamente a cada tanda de análisis de muestras se preparó una curva de calibración. Las curvas de calibrado para la OTC fueron lineales en un rango de 0,04 – 20 µg/ml, con unos coeficientes de correlación R^2 de 0,996 (**Figura 22**). La recuperación media de OTC en el suelo fue >70%. La precisión intra-día e inter-día presentó un coeficiente de variación <5%. No existió ninguna interferencia con los compuestos del medio lo que evidencia la especificidad del método. El límite cuantificación (LOQ) fue de 0,04 µg/ml para el suelo. El método utilizado fue específico para la sustancia analizada OTC, y no se observó en el cromatograma ninguna interferencia con los compuestos del medio (**Figura 23**).

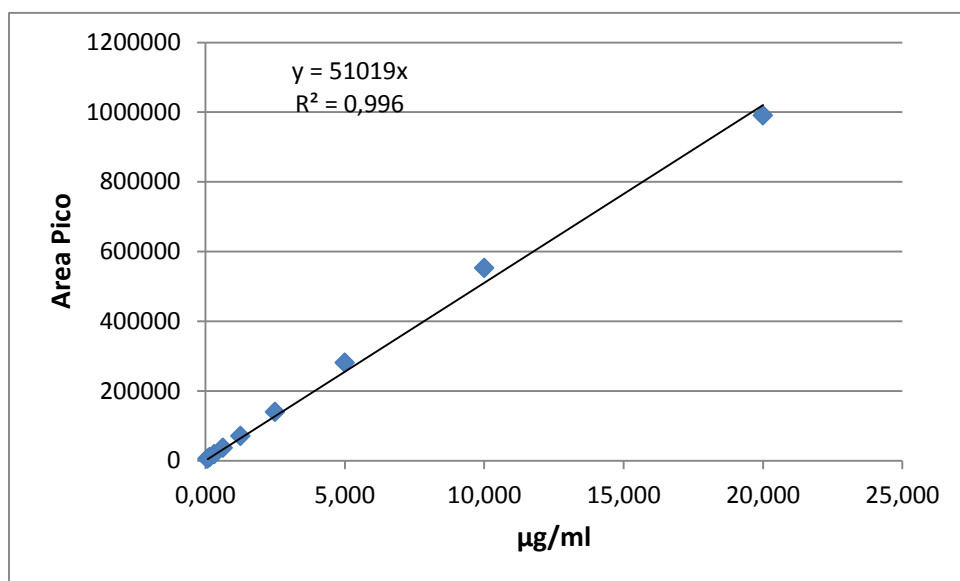


Figura 22. Recta de calibrado de OTC para el análisis en suelo

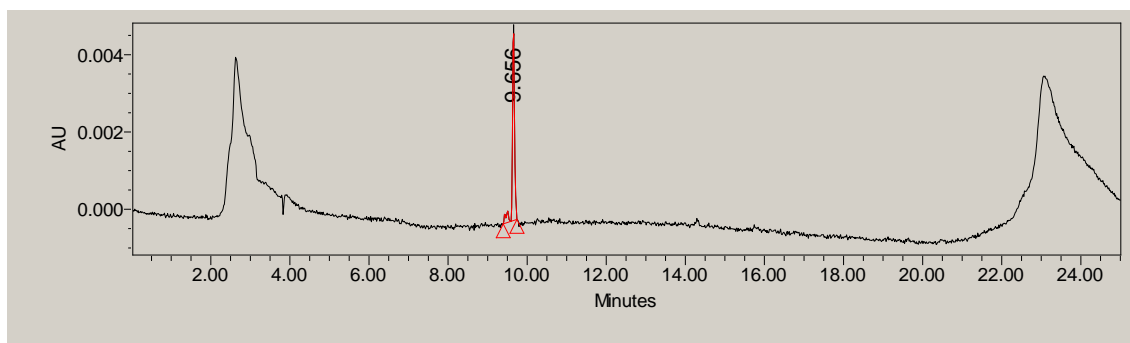


Figura 23. Cromatograma correspondiente a una muestra fortificada 0,8 mg OTC/sistema MS3 (8 kg suelo-arena (1:1) p.s.). Muestra recogida en los 5 cm primeros a los 21 días de exposición.

2.2.3. Análisis de oxitetraciclina en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* del sistema multi-especie en suelo

Procedimiento de extracción

El método se basa en el procedimiento descrito por Boscher *et al.* (2010) y consiste en la extracción de OTC con buffer McIlvaine a pH 4,6 conteniendo 0,3% de EDTA- Na_2 , 0,5 M, en muestras de homogeneizado de lombriz en baño de ultrasonidos y la posterior purificación del extracto, mediante dispersión en fase sólida dSPE (dispersive Solid Phase Extraction) con PSA (Primary Secondary Amine).

Extracción de las muestras

A 2 gramos (peso húmedo) de una muestra de lombrices, se añade 0,1 ml de una solución de tetraciclina (3,5 3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en metanol) como estándar interno. Se adicionan 5 ml del buffer de extracción y se homogeneiza mediante un instrumento de dispersión de alto rendimiento (T25 ULTRA-TURRAX®, IKA) a 2400 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se introduce la muestra en un baño de ultrasonidos durante 15 min y se centrifuga 15 minutos a 4200 rpm. (Centrífuga UNIVERSAL 16, Hettich). Se toman 3 ml del sobrenadante y se transfieren a otro tubo que contiene 250 mg de PSA; se agita, en agitador tipo vórtex durante 1 minuto, se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos (Centrífuga UNIVERSAL 16, Hettich) y se transfieren 1,5 ml al vial de inyección para su análisis cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

La determinación de OTC se lleva a cabo por HPLC-MS, utilizando la tetraciclina (TC) como estándar interno. El cromatógrafo empleado fue un sistema HPLC serie 1200, con detector Triple Quad LC/MS 6410, Agilent Technologies. Se empleó una columna Luna C18(2) [5 µm 250 x 3,6 mm] (Phenomenex). La temperatura fue de 40 °C. Tiempo post-run: 10 minutos. Volumen de inyección: 10 µl. Detector: G6410A QQQ (método MRM positivo OTC Larga.m). Temp. Gas: 250 °C. Presión Nebulizador: 50 psi. El flujo se fijó en 0,8 ml/min. La fase móvil, en gradiente, consistió en una mezcla acetonitrilo (A), ácido fórmico 0,1 % (B) y metanol (C) según se especifica a continuación:

| Tiempo (minutos) | % A | % B | % C |
|---------------------|------|------|------|
| 0 | 10,5 | 85,0 | 4,5 |
| 5 | 35,0 | 50,0 | 15,0 |
| 10 | 70,0 | - | 30,0 |
| 15 | 10,5 | 85,0 | 4,5 |

Para la cuantificación de la OTC presente en las muestras se utilizó el método del estándar interno. La solución stock (2 mg OTC/ml) y las soluciones de trabajo de OTC se prepararon en metanol. La solución stock del estándar interno de tetraciclina (1 mg TC /ml) y solución de trabajo (3,5 µg/ml) también se preparó en metanol. Previamente a cada tanda de análisis de muestras se preparó una curva de calibración de OTC por medio de soluciones de trabajo de OTC en un rango de 1,95 – 500 ng/ml (ng/g). Estas soluciones de trabajo de OTC se preparan a su vez a partir de la solución stock inicial por diluciones sucesivas con ácido fórmico al 0,1%. Las curvas de calibrado para la OTC fueron lineales en un rango de 1 – 20 ng/ml (ng/g), con unos coeficientes de correlación R^2 de 0,9998 (**Figura 24**). La recuperación media de OTC en la lombriz fue >99%. La precisión intra- día e inter- día presentó un coeficiente de variación <5%. No existió ninguna interferencia con los compuestos del medio lo que evidencia la especificidad del método. El límite cuantificación (LOQ) fue de 1 ng/ml (ng/g) para la lombriz. El método utilizado fue específico para la sustancia analizada OTC, y no se observó en el cromatograma ninguna interferencia con los compuestos del medio (**Figuras 24 y 25**).

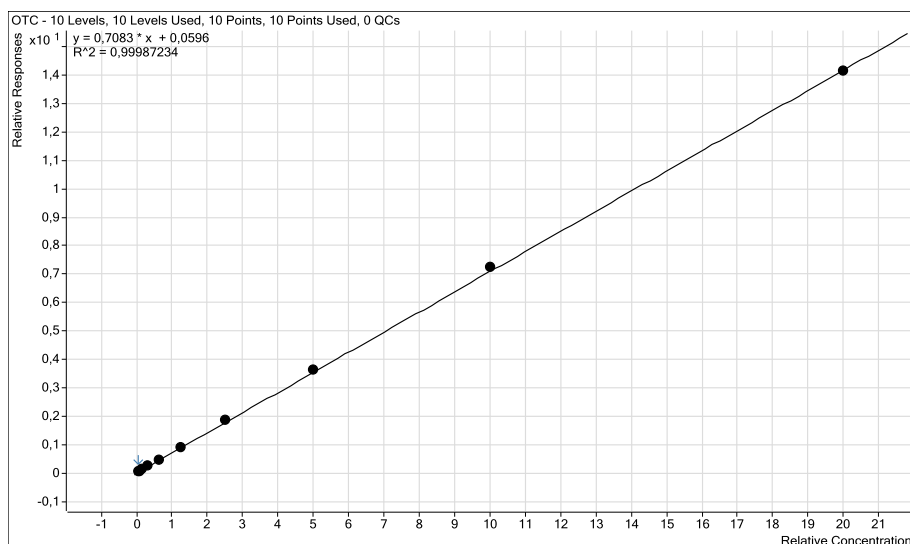
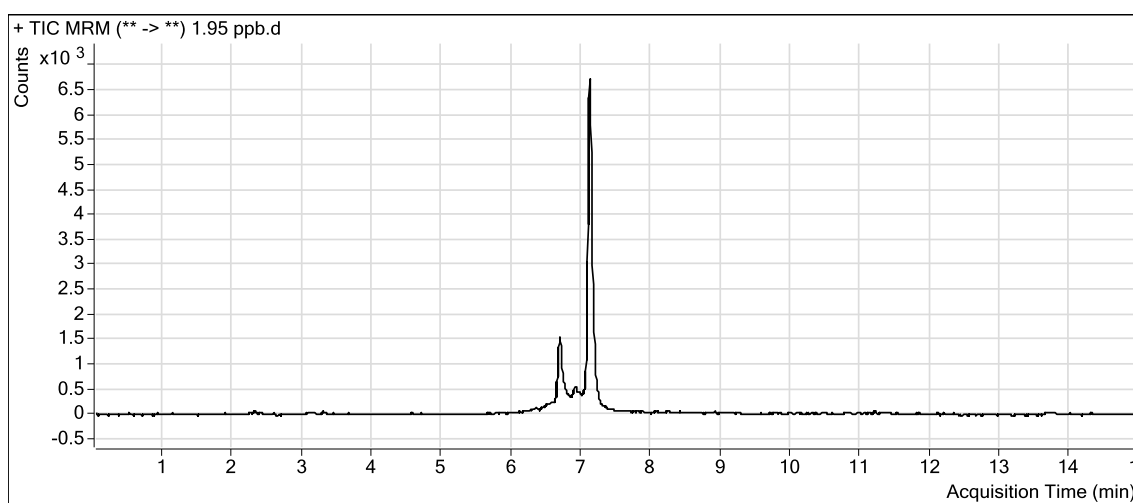


Figura 24. Recta de calibrado de OTC para el análisis en la lombriz *Eisenia andrei* del ensayo con sistemas MS3

Analysis Info

Acq Time 17/04/2013 16:04
Data File 1.95 ppb.d
Acq Method File MRM positivo OTC Larga.m
Sample Name Estandar 1.95 con 50 ppb TC
Sample Info
Sample Type Calibration
Level 1
Sample Pos Vial 2
Sample Chromatogram

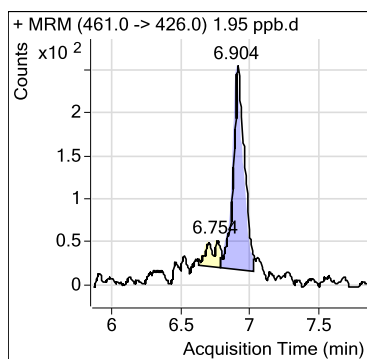


Quantitation Results

| Compound | ISTD | RT | Response | ISTD Resp |
|----------|------|-------|----------|-----------|
| OTC | TC | 6,904 | 1356 | 28204 |

Compound Graphics

Target Compound OTC



ISTD Compound TC

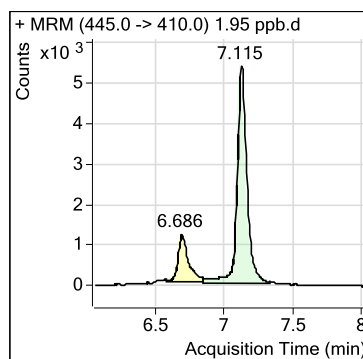
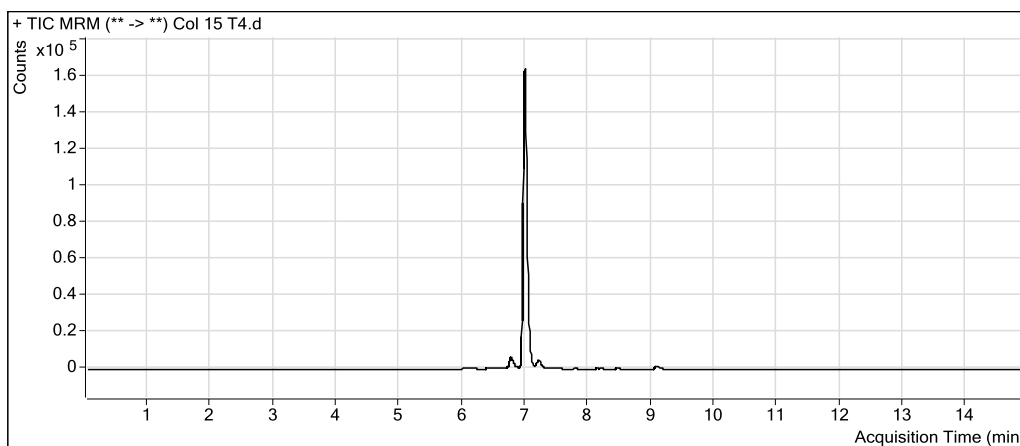


Figura 25. Cromatograma correspondiente a una muestra de lombriz fortificada con 1,95 ng OTC/g.

Analysis Info

Acq Time 18/04/2013 2:28
Data File Col 15 T4.d
Acq Method File MRM positivo OTC Larga.m
Sample Name Worms Col 15 T4
Sample Info
Sample Type Sample
Level
Sample Pos Vial 26
Sample Chromatogram

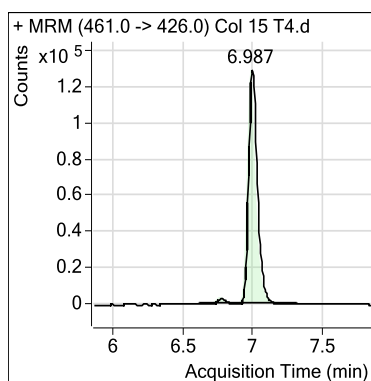


Quantitation Results

| Compound | ISTD | RT | Response | ISTD Resp |
|----------|------|-------|----------|-----------|
| OTC | TC | 6.987 | 597465 | 18519 |

Compound Graphics

TARGET Compound OTC



TARGET and ISTD Compounds OTC + TC

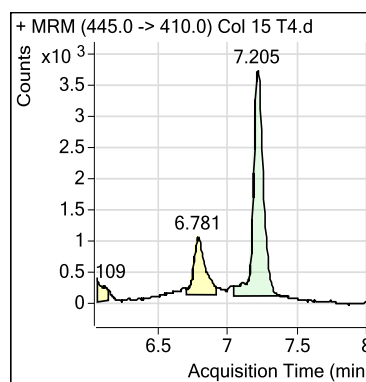


Figura 26. Cromatograma correspondiente a una muestra problema de lombriz obtenida en un sistema MS3 (8 kg suelo-arena (1:1) p.s.) expuesto a un riego individual conteniendo 800 mg de OTC.

Preparación de soluciones

- Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica, dihidrato (EDTA) 0,5 M: Disolver 93 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Ácido cítrico monohidrato 0,2 M: Disolver 21,0 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Di-sodio hidrógeno fosfato 12 hidrato 0,4 M: Disolver 71,628 g en 500 ml de agua Milli-Q
- Buffer McIlvaine pH 4,6: 90 ml de ácido cítrico monohidrato 0,2 M, 60 ml de di-sodio hidrógeno fosfato 12 hidrato 0,4 M y ajustar a pH 4,6 con ácido orto-fosfórico o sodio hidróxido.
- Buffer de extracción: Mezclar 37 ml de metanol, 37 ml de acetonitrilo, 25 ml de buffer McIlvaine pH 4,6 y 1 ml ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica, dihidrato (EDTA) 0,5 M
- Ácido fórmico 0,1 %: Diluir 1 ml de ácido fórmico a 1 L de agua Milli-Q
- Solución stock inicial de tetraciclina (TC) 1 mg/ml en metanol
- Solución de tetraciclina en ácido fórmico al 0,1% conteniendo 1 µg/ml obtenida a partir de la solución stock/inicial (0,1 ml a 10 ml y 1 ml a 10 ml).
- Solución de trabajo del estándar interno de tetraciclina en metanol 3,5 µg/ml

2.3. Análisis estadístico

Los resultados que se presentan son representativos de 3 experimentos, se presentan como el valor medio \pm desviación estándar (DS) de 3 experimentos. Las comparaciones entre los grupos de tratamiento y de control se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de un procedimiento de comparación múltiple, para determinar que medias son estadísticamente significativas unas de otras, en el nivel de confianza del 95% (STATGRAPHICS Plus 5.0, Statistical Graphics Corp.). El método que se utiliza para discriminar entre las medias es el procedimiento de menor diferencia significativa de Fisher (STATGRAPHICS Plus 5.0, Statistical Graphics Corp.).

EC₁₀, EC₂₀ y EC₅₀ se calcularon en base a la curva concentración-efecto con el programa STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp.).

2.4. Reactivos

1,3,5 Trifenilformazan ($C_{19}H_{16}N_4$); M=300,4; SIGMA T-1276

2,3,5 Trifeniltetrazolio cloruro ($C_{19}H_{15}ClN_4$); M=334,81; SIGMA T-8877

Acetonitrilo (CH_3CN); M = 41,05; 261881

Acetonitrilo (HPLC-preparativa) PAI CH_3CN , M= 41,05. PANREAC

Ácido bórico H_3BO_3 , M = 61,83. PANREAC 131.015.1210

Ácido cítrico monohidrato ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$); M = 210,14; MERCK 100244

Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, M = 372,24. PANREAC 131669.1211

Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica dihidrato (EDTA) $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ M=372,42; PANREAC 131669

Ácido fórmico CH_2O_2 M = 46,03. FLUKA 56302

Ácido ortofosfórico (H_3PO_4); M = 98. PANREAC 131032

Ácido oxálico dihidrato (ácido etanodioico) $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$, M = 126,07. SCHARLAU

Ácido sulfónico 4-morfolin propano (MOPS). SIGMA M1254-25G

Agua Milli-Q

Alfalfa deshidratada en polvo

Calcio cloruro 2-hidrato $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, M = 147,02. PANREAC131232.1210

Cobalto II nitrato 6-hidrato $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, M = 291,04. SCHARLAU 29721/0298

Cobre (II) sulfato 5-hidrato $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, M = 249,70. SIGMA C-6283

D-(+)- Glucosa $C_6H_{12}O_6$; M=180,16. SIGMA (G5400), PANREAC (141341)

Di-potasio hidrógeno fosfato K_2HPO_4 , M = 174,18. PANREAC 121512.210

Di-sodio hidrogeno fosfato 12 hidrato $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, M = 358. PANREAC 131678

Hierro cloruro 6-hidrato $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, M = 270,30. SIGMA F-2877

Magnesio sulfato 7-hidrato $MgO_4S \cdot 7H_2O$, M = 246,48. MERCK 5000 1.05886.5000

Manganeso II cloruro 4 -hidrato $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, M = 197,91. PANREAC 131.410

Metanol CH_3OH , M = 32,04. PANREAC 141091

Metanol PAI-ACS (UV-IR-HPLC-HPLC isocrático) CH_3OH , M=32,04. PANREAC

Oxitetraciclina clorhidrato $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$, M = 496,9. PANREAC 374948.1606

PSA (Primary Secondary Amine); Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, 52738-U
SUPELCO

Sodio acetato 3-hidrato $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, M = 136. PANREAC 131632

Sodio carbonato Na_2CO_3 , M = 105,99. MERCK 1.06392.0500

Sodio hidróxido $HONa$, M = 40. MERCK 106498

Sodio molibdato 2-hidrato $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, M = 241,95. PANREAC 131.701

Sodio nitrato $NaNO_3$, M = 84,99. PANREAC 131702.1210

Tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot 3H_2O$); M = 498,48; FLUKA 87128

Zinc sulfato 7-hidrato $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, M = 287,54. PANREAC 131.787

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Efectos de oxitetraciclina en el crecimiento de la planta acuática *Lemna minor*

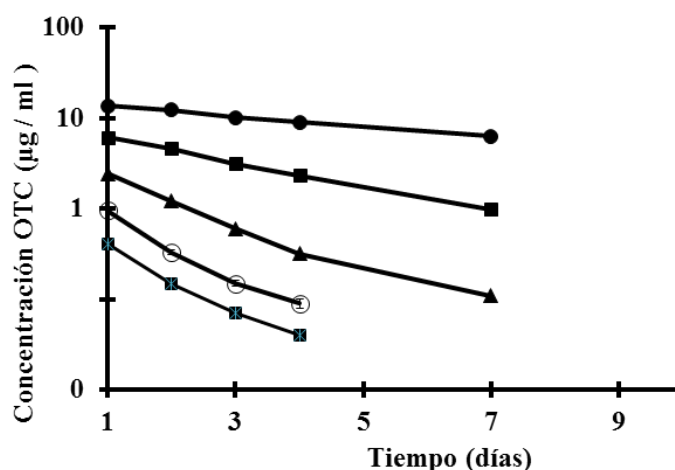
La **Tabla 9** presenta las concentraciones de oxitetraciclina (OTC) obtenidas en el medio de crecimiento después del tratamiento de OTC en el medio de crecimiento de la planta acuática (5 tratamientos, dosis única de aplicación: 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) a distintos tiempos tras el tratamiento (0, 1, 2, 3, 4, y 7 días).

Tabla 9. Concentraciones de OTC en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* después del tratamiento de OTC en el medio de crecimiento de la planta acuática (5 tratamientos: dosis de aplicación única de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml)

| Tratamientos OTC (µg/ml) | | OTC (µg/ml) | | | | | |
|--------------------------------|----|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | | Días tras tratamiento | | | | | |
| | | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 7 |
| T1 | 1 | 0,80 ± 0,02 | 0,41 ± 0,01 | 0,15 ± 0,002 | 0,07 ± 0,004 | 0,04 ± 0,001 | < LOQ |
| T2 | 2 | 1,79 ± 0,02 | 0,95 ± 0,05 | 0,33 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | < LOQ |
| T3 | 4 | 3,76 ± 0,02 | 2,45 ± 0,06 | 1,22 ± 0,09 | 0,60 ± 0,06 | 0,32 ± 0,04 | 0,11 ± 0,01 |
| T4 | 8 | 7,69 ± 0,08 | 6,13 ± 0,17 | 4,59 ± 0,29 | 3,16 ± 0,22 | 2,32 ± 0,21 | 0,98 ± 0,13 |
| T5 | 16 | 15,68 ± 0,18 | 13,68 ± 0,34 | 12,24 ± 0,13 | 10,18 ± 0,21 | 9,05 ± 0,16 | 6,28 ± 0,08 |

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos

La **Figura 27** presenta las concentraciones medias de OTC tras los tratamientos (5 tratamientos: 1 (□), 2 (⊗), 4 (▲), 8 (■), y 16 (●) µg OTC/ml).



Los niveles medios de OTC obtenidos en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor*, tras la exposición de OTC (5 tratamientos, dosis única de aplicación: 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) se fijaron a un modelo monocompartimental usando el programa WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (Yamaoka *et al.*, 1978). Las curvas de disposición de OTC presentan la siguiente ecuación lineal

$$C = C_0 \cdot e^{-K_e \cdot t}$$

donde C es la concentración de OTC

C_0 es la concentración inicial a tiempo 0

K_e , constante de eliminación

t, tiempo

Se calculó:

- las semividas de eliminación ($t_{1/2e}$): $t_{1/2e} = 0,693/K_e$
- la concentración media de OTC (C_{0-t}) a la que la planta acuática *L. minor* está expuesta en el periodo de 7 días del ensayo (ECB, 2003):

$$C_{0-t} = C_{t0} \left(\frac{(1 - e^{-K_e \cdot t})}{K_e \cdot t} \right)$$

siendo,

c_{t0} : concentración inicial de OTC

t: tiempo (día)

K_e : constante de eliminación

| Tratamientos OTC ($\mu\text{g/ml}$) | | K_e (día^{-1}) | $t_{1/2e}$ (días) | Concentración media ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|-----------|--------------------------------|----------------------|---|
| T1 | 1 | 0,7759 | 0,89 | 0,15 |
| T2 | 2 | 0,7826 | 0,89 | 0,33 |
| T3 | 4 | 0,5245 | 1,32 | 1,00 |
| T4 | 8 | 0,3011 | 2,30 | 3,21 |
| T5 | 16 | 0,1320 | 5,25 | 10,23 |

Las **Tablas 10 - 16** representan los efectos de los diversos tratamientos de OTC sobre la planta acuática *L. minor*:

- Temperatura, iluminancia, pH y conductividad eléctrica en el medio de crecimiento (Tabla 10)
- Número de frondas en la planta acuática *L. minor* (Tabla 11)
- Peso húmedo y peso seco de frondas de *L. minor* (Tabla 12)
- Tasa específica de crecimiento (μ) del número de frondas de *L. minor* (Tabla 13)
- Tasa específica de crecimiento (μ) del peso húmedo y del peso seco de *L. minor* (Tabla 14)
- Rendimiento (y) del número de frondas de *L. minor* (Tabla 15)
- Rendimiento (y) del peso húmedo y del peso seco de *L. minor* (Tabla 16)
- Estimaciones de EC_{10} , EC_{20} y EC_{50} para la tasa de crecimiento y el rendimiento de las frondas, peso fresco y peso seco de *L. minor*.

Tabla 10. Temperatura, iluminancia, pH y conductividad eléctrica en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* tras tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml)

| Tratamientos OTC (µg/ml) | | Valores medios durante 7 días tras tratamiento | | | |
|--------------------------------|-----------|--|----------------------|-------------|--|
| | | Temperatura (°C) | Iluminancia (lux) | pH | Conductividad eléctrica (µSiemens/cm a 25 °C) |
| Control | 0 | 20,7 ± 0,14 | 7523 ± 549 | 6,55 ± 0,04 | 364,5 ± 5,09 |
| T1 | 1 | 20,5 ± 0,06 | 7325 ± 305 | 6,59 ± 0,01 | 361,3 ± 2,56 |
| T2 | 2 | 20,6 ± 0,04 | 7562 ± 624 | 6,60 ± 0,01 | 370,6 ± 4,38 |
| T3 | 4 | 20,5 ± 0,08 | 7505 ± 959 | 6,59 ± 0,01 | 367,9 ± 7,50 |
| T4 | 8 | 20,4 ± 0,05 | 7179 ± 859 | 6,57 ± 0,02 | 370,0 ± 5,77 |
| T5 | 16 | 20,4 ± 0,01 | 7924 ± 551 | 6,46 ± 0,01 | 372,8 ± 5,84 |

Valores medios ± DS, de 3 experimentos

En la **Tabla 10** se observa como los parámetros determinados, para cada grupo de tratamiento, no muestran diferencias estadísticamente significativas durante los 7 días del ensayo y por tanto, podemos concluir, que los parámetros determinados en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor*, temperatura, iluminancia, pH y conductividad eléctrica son homogéneos para todos los grupos de tratamiento y no influyen en el crecimiento vegetativo de la planta acuática *L. minor*, tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml), a lo largo de los 7 días de duración del ensayo.

Tabla 11. Número de frondas de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml)

| Tratamientos OTC (µg/ml) | | Número de frondas | | | | | | |
|--------------------------------|----|-----------------------|--------------|---|--|--|--|--|
| | | Días tras tratamiento | | | | | | |
| | | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| Control | 0 | 15,67 ± 2,31 | 18,33 ± 4,04 | 25,00 ± 2,00 | 31,67 ± 3,51 | 39,67 ± 4,51 | 54,00 ± 6,00 | 69,33 ± 6,43 |
| T1 | 1 | 14,67 ± 1,15 | 17,00 ± 1,00 | 22,67 ± 0,58 | 27,33 ± 1,15*** (-13,68) ^a | 37,33 ± 1,15 | 47,67 ± 0,58*** (-11,73) ^a | 58,00 ± 3,46*** (-16,35) ^a |
| T2 | 2 | 14,67 ± 1,53 | 15,67 ± 0,58 | 19,00 ± 2,00** (-24,00) ^a | 24,33 ± 1,15*** (-23,16) ^a | 29,00 ± 1,00*** (-26,89) ^a | 41,33 ± 1,53*** (-23,46) ^a | 51,00 ± 3,46*** (-26,44) ^a |
| T3 | 4 | 14,00 ± 2,00 | 15,33 ± 2,08 | 18,67 ± 2,52** (-25,33) ^a | 12,33 ± 1,53*** (-61,05) ^a | 11,00 ± 1,73*** (-72,27) ^a | 12,33 ± 0,58*** (-77,16) ^a | 17,33 ± 4,16*** (-75,00) ^a |
| T4 | 8 | 13,33 ± 0,58 | 16,00 ± 1,00 | 17,33 ± 0,58** (-30,67) ^a | 12,67 ± 0,58*** (-60,00) ^a | 11,33 ± 1,53*** (-71,43) ^a | 11,33 ± 0,58*** (-79,01) ^a | 12,00 ± 0,00*** (-82,69) ^a |
| T5 | 16 | 13,67 ± 0,58 | 16,00 ± 2,00 | 18,33 ± 3,06** (-26,67) ^a | 10,67 ± 1,15*** (-66,32) ^a | 12,33 ± 0,58*** (-68,91) ^a | 11,33 ± 0,58*** (-79,01) ^a | 11,00 ± 1,00*** (-84,13) ^a |

Nota: al inicio del ensayo se inoculan 12 frondas de *L. minor* (día 0)

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos, estadísticamente significativas respecto al grupo control ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

^aPorcentaje sobre el control

En la **Tabla 11** se observa la evolución del crecimiento vegetativo de la planta acuática *L. minor*, determinado mediante el recuento diario del número de frondas en cada grupo de tratamiento, tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml):

- En el día 3 del ensayo, la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC), estadísticamente significativo (** $p < 0,01$) frente al grupo control es de 2 µg OTC/ml, mientras que la concentración a la que no se observa ningún efecto adverso (NOEC) es de 1 µg OTC/ml; los efectos observados son dosis-dependiente.
- En el día 4 del ensayo, esta inhibición del crecimiento, estadísticamente significativa (*** $p < 0,001$) frente al grupo control, aumenta y ahora la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo (*** $p < 0,001$) frente al grupo control es de 1 µg OTC/ml, no hay ninguna concentración que no produzca efecto adverso (NOEC) y los efectos observados son dosis dependiente.

- En el día 5 del ensayo, la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo ($***p<0,001$) frente al grupo control es de 2 μg OTC/ml y la concentración para la que no se observan diferencias estadísticamente significativas frente al control (NOEC) es de 1 μg OTC/ml, los efectos observados son dosis dependiente.
- En los días 6 y 7 del ensayo, aumenta la inhibición del crecimiento de la planta acuática *L. minor*; la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo ($***p<0,001$) frente al grupo control es de 1 μg OTC/ml y los efectos son dosis-dependiente.

Tabla 12. Peso húmedo y peso seco de las frondas de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 μg OTC/ml) al final del ensayo (día 7).

| Tratamientos OTC ($\mu\text{g/ml}$) | | Día 7 | |
|---|----|--|---|
| | | Peso fresco (mg) | Peso seco a 60°C (mg) |
| Control | 0 | 71,77 \pm 7,22 | 5,27 \pm 0,49 |
| T1 | 1 | 57,70 \pm 1,40 | 4,40 \pm 0,10*** (-16,46) ^a |
| T2 | 2 | 46,03 \pm 2,51** (-35,86) ^a | 3,67 \pm 0,21 *** (-30,38) ^a |
| T3 | 4 | 39,63 \pm 3,33** (-44,77) ^a | 3,30 \pm 0,35*** (-37,34) ^a |
| T4 | 8 | 28,03 \pm 0,47** (-60,94) ^a | 3,00 \pm 0,10*** (-43,04) ^a |
| T5 | 16 | 25,53 \pm 2,07** (-64,42) ^a | 2,73 \pm 0,21 *** (-48,10) ^a |

Valores medios \pm DS (desviación estándar) de 3 experimentos, estadísticamente significativos con respecto al control $**p<0,01$; $***p<0,001$

^aPorcentaje sobre el control

Los valores obtenidos para el peso fresco de las frondas de la planta acuática *L. minor* (**Tabla 12**), obtenidos a la finalización del ensayo (día 7) tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) demuestran que la concentración más baja que produce efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo (** $p < 0,01$) frente al grupo control es de 2 µg OTC/ml y la concentración para la que no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (NOEC) es de 1 µg OTC/ml, siendo los efectos observados dosis-dependiente.

Los valores obtenidos para el peso seco a 60 °C de las frondas de la planta acuática *L. minor* (**Tabla 12**), obtenidos a la finalización del ensayo (día 7) tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) demuestran que la concentración más baja que produce efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo (** $p < 0,001$) frente al grupo control es de 1 µg OTC/ml y los efectos observados dosis-dependiente.

Es de resaltar que la planta *L. minor* sin tratamiento o grupo control, al inicio del ensayo, tenía valores de peso fresco de $14,18 \pm 1,03$ mg y de peso seco de $2,08 \pm 0,12$ mg. Por lo tanto, el crecimiento de la planta observado al final del experimento (día 7) fue óptimo para el grupo control, mientras que los grupos de tratamiento con respecto al grupo control sufrieron una reducción de dicho crecimiento en lo que respecta al peso fresco y seco de las frondas.

Las **Tablas 13 y 14** presentan la tasa específica de crecimiento del número de frondas, peso fresco y peso seco de la planta acuática *L. minor* en presencia y ausencia de oxitetraciclina.

La *tasa específica de crecimiento* (μ): desde el día 1 hasta el día 7 tras el tratamiento se ha calculado utilizando la siguiente fórmula

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

siendo:

- μ_{i-j} : tasa específica de crecimiento entre los tiempos día 0 (i) y día transcurrido tras tratamiento (j)
- N_i : número de frondas en el control, o bien peso fresco o peso seco a 60°C de frondas en el control

- N_j : número de frondas tras tratamiento a un tiempo (j), o bien peso fresco o peso seco a 60°C de frondas tras tratamiento a un tiempo (j)
- t: tiempo (días) transcurrido entre la medida a tiempo (i) y a tiempo (j)

Fijándonos, como ejemplo, en el tratamiento T2 (2 µg OTC/ml), a los 7 días tras tratamiento se obtiene para el número de frondas un valor medio de la tasa específica de crecimiento:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 53 - \ln 12}{7} = 0,212$$

7

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 53 - \ln 12}{7} = 0,212$$

Valor medio de 0,206 ± 0,01

7

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 47 - \ln 12}{7} = 0,195$$

7

Fijándonos, como ejemplo, en el tratamiento T2 (2 µg OTC/ml), a los 7 días tras tratamiento se obtiene para el peso fresco un valor medio de la tasa específica de crecimiento:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 33,8 - \ln 14,18}{7} = 0,174$$

7

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 32,7 - \ln 14,18}{7} = 0,171$$

Valor medio de 0,168 ± 0,01

7

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln 29,0 - \ln 14,18}{7} = 0,159$$

7

Tabla 13. Tasa específica de crecimiento (μ) del número de frondas de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 μg OTC/ml) durante los 7 días del ensayo

| Tratamientos OTC ($\mu\text{g/ml}$) | | Tasa específica de crecimiento para el número de frondas (μ) |
|---|-----------|--|
| Control | 0 | $0,241 \pm 0,048$ |
| T1 | 1 | $0,210 \pm 0,005$ |
| T2 | 2 | $0,169 \pm 0,005^{***}$ (-30,06) ^a |
| T3 | 4 | $0,066 \pm 0,031^{***}$ (-72,55) ^a |
| T4 | 8 | $0,061 \pm 0,034^{***}$ (-74,59) ^a |
| T5 | 16 | $0,052 \pm 0,009^{***}$ (-78,58) ^a |

Valores medios \pm DS (desviación estándar), de 3 experimentos, valores estadísticamente significativos con respecto al control *** $p < 0,001$

^aPorcentaje sobre el control

Tabla 14. Tasa específica de crecimiento (μ) del peso húmedo y del peso seco de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 μg OTC/ml) al final del ensayo (día 7).

| Tratamientos OTC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | Tasa específica de crecimiento (μ) a partir del peso fresco (mg) de las frondas en el día 7 tras tratamiento | Tasa específica de crecimiento (μ) a partir del peso seco a 60 °C (mg) de las frondas en el día 7 tras tratamiento |
|--|----|--|---|
| Control | 0 | 0,231 \pm 0,015 | 0,132 \pm 0,014 |
| T1 | 1 | 0,200 \pm 0,031*** (-13,28) ^a | 0,107 \pm 0,003*** (-19,14) ^a |
| T2 | 2 | 0,168 \pm 0,008*** (-36,62) ^a | 0,081 \pm 0,008*** (-38,96) ^a |
| T3 | 4 | 0,146 \pm 0,012*** (-72,55) ^a | 0,065 \pm 0,015*** (-50,63) ^a |
| T4 | 8 | 0,084 \pm 0,012*** (-74,59) ^a | 0,052 \pm 0,005*** (-60,59) ^a |
| T5 | 16 | 0,052 \pm 0,009*** (-63,80) ^a | 0,039 \pm 0,011*** (-70,84) ^a |

Valores medios \pm DS (desviación estándar), de 3 experimentos estadísticamente significativos con respecto al control; *** $p < 0,001$

^aPorcentaje sobre el control

En las **Tablas 13 y 14** se observa como de forma paralela al efecto observado anteriormente sobre el número de frondas, el peso fresco y seco de las frondas de la planta *L. minor*, los tratamientos con OTC también originan una reducción estadísticamente significativa, dosis dependiente, de la tasa específica de crecimiento. Los resultados de la tasa específica de crecimiento (**Tabla 13**), con respecto al número de frondas de la planta acuática *L. minor*, tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 μg OTC/ml) a la finalización del ensayo (día 7) muestran que la concentración más baja que produce efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo (*** $p < 0,001$) frente al grupo control es de 2 μg OTC/ml y la concentración para la que no se observa efecto adverso (NOEC) es de 1 μg OTC/ml. Los resultados de la tasa específica de crecimiento, con respecto peso fresco y al peso seco (**Tabla 14**) de las frondas de la planta acuática *L. minor*, tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos:

dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) a la finalización del ensayo (día 7) muestran que la concentración más baja que produce efecto adverso (LOEC) estadísticamente significativo ($***p<0,001$) es de 1 µg OTC/ml, no pudiendo establecer un NOEC.

Finalmente las **Tablas 15** y **16** recogen los resultados obtenidos del rendimiento del número de frondas, peso fresco y peso seco de las frondas de la planta acuática *L. minor* tras la exposición a oxitetraciclina.

Tabla 15. Rendimiento (y) del número de frondas de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml)

| Tratamientos OTC (µg/ml) | | Rendimiento (y) del numero de frondas | | |
|--------------------------------|-----------|---|---|--|
| | | Días tras tratamiento | | |
| | | Día 3 | Día 5 | Día 7 |
| Control | 0 | 13,00 ± 2,00 | 27,67 ± 4,50 | 57,33 ± 6,43 |
| T1 | 1 | 10,67 ± 0,58 | 25,33 ± 1,15*** (-8,43) ^a | 46,00 ± 3,46** (-19,77) ^a |
| T2 | 2 | 7,00 ± 2,00** | 17,00 ± 1,00*** (-38,55) ^a | 39,00 ± 3,46** (-31,98) ^a |
| T3 | 4 | 6,67 ± 2,52** (-48,72) ^a | 3,33 ± 1,15*** (-87,95) ^a | 0 |
| T4 | 8 | 5,33 ± 0,58** (-58,97) ^a | 0 | 0 |
| T5 | 16 | 6,33 ± 3,06** (-51,28) ^a | 0 | 0 |

Nota: el rendimiento se obtiene por la diferencia del valor inicial (tiempo 0 días) y el valor final (en el día 3, 5, y 7 tras el tratamiento). Valores medios ± DS (desviación estándar), de 3 experimentos, estadísticamente significativos con respecto al control ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.
^aPorcentaje sobre el control

Tabla 16. Rendimiento (y) del peso fresco y del peso seco de la planta acuática *L. minor* tras el tratamiento del medio de crecimiento con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml) al final del ensayo (día 7)

| Tratamientos OTC (µg/ml) | | Rendimiento (y) del peso fresco (mg) de las frondas en el día 7 tras tratamiento | Rendimiento (y) del peso seco a 60 °C (mg) de las frondas en el día 7 tras tratamiento |
|--------------------------------|----|---|---|
| Control | 0 | 57,58 ± 7,22 | 3,18 ± 0,49 |
| T1 | 1 | 43,52 ± 1,40 | 2,32 ± 0,10*** (-27,23) ^a |
| T2 | 2 | 31,85 ± 2,51*** (-44,69) ^a | 1,58 ± 0,21*** (-50,26) ^a |
| T3 | 4 | 24,45 ± 3,33*** (-55,80) ^a | 1,22 ± 0,35*** (-61,78) ^a |
| T4 | 8 | 13,85 ± 0,47*** (-75,95) ^a | 0,92 ± 0,10*** (-71,20) ^a |
| T5 | 16 | 6,33 ± 3,06*** (-80,29) ^a | 0,65 ± 0,21*** (-79,58) ^a |

Nota: el rendimiento se obtiene por la diferencia del valor inicial (tiempo 0 días) y el valor final (en el día 7 tras el tratamiento). Valores medios ± DS (desviación estándar), de 3 experimentos, estadísticamente significativos con respecto al control *** $p < 0,001$. ^aPorcentaje sobre el control

Respecto al parámetro rendimiento del número de frondas de la planta acuática *L. minor*, se observó un efecto inhibitorio dosis- y tiempo-dependiente (**Tabla 15**):

- En el día 3 del ensayo, se pudo establecer un LOEC para la dosis de 2 µg OTC/ml, (** $p < 0,01$) y un NOEC de 1 µg OTC/ml.
- En el día 5 y 7 del ensayo el LOEC fue 1 µg OTC/ml. (** $p < 0,001$), y no se pudo establecer un NOEC

Respecto al parámetro rendimiento del número del peso fresco y seco de las frondas de la planta acuática *L. minor*, a la finalización del ensayo (día 7) también se observó un efecto inhibitorio dosis-dependiente (**Tabla 16**), el LOEC más bajo se estableció para el peso seco 1 µg OTC/ml. (** $p < 0,001$), sin poder fijarse un NOEC.

En base a los datos de concentración – respuesta de la tasa de crecimiento y del rendimiento, usando un modelo de regresión no lineal, se calcularon los valores de EC₁₀, EC₂₀ y EC₅₀, valores que corresponden a la inhibición del crecimiento de un 10, 20 y 50 %, respectivamente comparados con los controles (Tabla 17). Al final del experimento (día 7 del ensayo), la EC₁₀ alcanzó un rango de 0,21 – 1,36 µg OTC/ml, la EC₂₀ un rango de 0,48 – 1,36 µg OTC/ml, y la EC₅₀ en un rango de 1,92 – 7,15 µg OTC/ml

Tabla 17. Estimaciones de EC₁₀, EC₂₀ y EC₅₀ para los efectos de los tratamientos de oxitetraciclina (dosis única de aplicación: 1, 2, 4, 8 y 16 µg OTC/ml) en la finalización del ensayo (día 7) sobre la tasa de crecimiento y el rendimiento de las frondas, peso fresco y peso seco de la planta acuática *L. minor*.

| OTC (µg/ml) 1 2 4 8 16 | Frondas | | Peso fresco | | Peso seco | |
|---------------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | Tasa de crecimiento | Rendimiento | Tasa de crecimiento | Rendimiento | Tasa de crecimiento | Rendimiento |
| EC ₁₀ | 0,59 ± 0,09 | 1,36 ± 0,22 | 0,57 ± 0,12 | 0,32 ± 0,17 | 0,33 ± 0,30 | 0,21 ± 0,32 |
| EC ₂₀ | 1,05 ± 0,06 | 1,25 ± 0,06 | 1,36 ± 0,08 | 0,64 ± 0,12 | 0,78 ± 0,20 | 0,48 ± 0,23 |
| EC ₅₀ | 3,49 ± 0,03 | 1,92 ± 0,04 | 7,15 ± 0,01 | 2,19 ± 0,52 | 4,49 ± 0,01 | 1,98 ± 0,44 |

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en base a la tasa de crecimiento y el rendimiento vegetativo de la planta *L. minor*, en la **Tabla 18** se sugieren los siguientes parámetros aplicables al análisis del riesgo ambiental de la oxitetraciclina (EMEA, 2003):

- PEC (concentración ambiental estimada)
- PNEC (concentración más alta de OTC que no origina efecto adverso en el medio ambiente, se calcula por la razón del NOEC/factor de seguridad 10, ó en casos de no tener un NOEC, se aplicara LOEC/factor de seguridad 30)
- PEC/PNEC (nivel sin efecto predecible)

Tabla 18. Estimaciones de los parámetros PEC, NOEC, LOEC, EC₅₀, PNEC y PEC/PNEC aplicables al análisis del riesgo ambiental de la oxitetraciclina en la finalización del ensayo (día 7): dosis única de aplicación: 1, 2, 4, 8 y 16 µg OTC/ml sobre la tasa de crecimiento y el rendimiento de las frondas, peso fresco y peso seco de la planta acuática *L. minor*.

| Parámetro | PEC (µg OTC/ml) | NOEC (µg OTC/ml) | LOEC (µg OTC/ml) | EC ₅₀ (µg OTC/ml) | PNEC (µg OTC/ml) | PEC/PNEC |
|--|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|----------|
| Tasa específica de crecimiento nº de frondas | 2 | 1 | 2 | 3,49 ± 0,03 | 0,1 | 20 |
| Tasa específica de crecimiento del peso fresco | 1 | - | 1 | 7,15 ± 0,01 | 0,03 | 33,33 |
| Tasa específica de crecimiento del peso seco | 1 | - | 1 | 4,49 ± 0,01 | 0,03 | 33,33 |
| Rendimiento para nº de frondas | 1 | - | 1 | 1,92 ± 0,04 | 0,03 | 33,33 |
| Rendimiento para peso fresco | 2 | 1 | 2 | 2,19 ± 0,52 | 0,1 | 20 |
| Rendimiento para peso seco | 1 | - | 1 | 1,98 ± 0,44 | 0,03 | 33,33 |

3.2. Efectos de oxitetraciclina en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Siguiendo la normativa aplicable a los ensayos de toxicidad en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*, ensayo en suelo artificial (suelo agrario de ensayo: mezcla suelo y arena en proporción 1:1), en primer lugar se determinan parámetros físico-químicos que aseguren condiciones óptimas y homogéneas en todos los experimentos a realizar. La **Tabla 19** recoge los parámetros físico-químicos, contenido de humedad (%), pH y conductividad eléctrica de la mezcla suelo:arena (1:1) en solución mezcla:agua (1:2,5) e iluminancia al inicio del

experimento (día 0) y al final (día 21). La **Tabla 20** presenta los efectos de los tratamientos con oxitetraciclina en el suelo agrario de ensayo sobre la lombriz de tierra *Eisenia andrei*.

Tabla 19. Parámetros físico químicos, contenido de humedad, pH y conductividad eléctrica en el suelo agrario de ensayo y la iluminancia del recipiente de ensayo al inicio del experimento (día 0) y al final (día 21), tras el tratamiento de todo el suelo agrario de ensayo con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg OTC/kg suelo p.s.)

| Tratamientos OTC (mg/kg suelo p.s.) | | Humedad (%) | | pH | | Conductividad eléctrica (μSiemens/cm a 25 °C) | | Iluminancia (Lux) | |
|---|------|-------------------------------|-----------|-------|------------|--|-----------|----------------------------|------------|
| | | En el suelo agrario de ensayo | | | | | | En el recipiente de ensayo | |
| | | Día 0 | Día 21 | Día 0 | Día 21 | Día 0 | Día 21 | Día 0 | Día 21 |
| Control | 0 | 8,8 | 8,8 ± 0,4 | 8,6 | 7,9 ± 0,03 | 139 | 169 ± 3,0 | 1333 ± 126 | 1323 ± 144 |
| T1 | 0,1 | 8,7 | 8,8 ± 0,2 | 8,6 | 8,0 ± 0,03 | 102 | 166 ± 4,1 | 1357 ± 179 | 1343 ± 202 |
| T2 | 1 | 8,9 | 8,9 ± 0,1 | 8,6 | 8,0 ± 0,01 | 109 | 166 ± 3,7 | 1450 ± 66 | 1453 ± 45 |
| T3 | 10 | 8,8 | 8,8 ± 0,3 | 8,6 | 7,9 ± 0,01 | 105 | 167 ± 2,8 | 1363 ± 32 | 1373 ± 45 |
| T4 | 100 | 8,7 | 8,7 ± 0,7 | 8,6 | 7,9 ± 0,01 | 108 | 166 ± 1,5 | 1290 ± 155 | 1283 ± 150 |
| T5 | 1000 | 8,9 | 8,9 ± 0,1 | 8,4 | 7,8 ± 0,03 | 183 | 164 ± 5,7 | 1283 ± 29 | 1300 ± 26 |

Valores medios \pm DS (desviación estándar) de 3 experimentos

Tabla 20. Efectos del tratamiento del suelo agrario de ensayo con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg OTC/kg suelo p.s.) sobre la lombriz de tierra *E. andrei* al inicio del experimento (día 0) y al final (día 21)

| Tratamientos OTC (mg/kg suelo p.s.) | | Lombriz de tierra <i>E. andrei</i> | | | |
|---|------|------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| | | Supervivencia (número) | Peso fresco (mg) | | Pérdida de peso (mg) |
| | | | Día 0 | Día 21 | |
| Control | 0 | 10,00 \pm 0,00 | 253,01 \pm 12,69 | 194,58 \pm 12,66 | 58,43 \pm 5,92 |
| T1 | 0,1 | 10,00 \pm 0,00 | 249,68 \pm 7,09 | 185,80 \pm 9,69 | 63,88 \pm 3,12 |
| T2 | 1 | 10,00 \pm 0,00 | 261,17 \pm 10,33 | 193,58 \pm 2,80 | 67,59 \pm 12,99 |
| T3 | 10 | 10,00 \pm 0,00 | 245,71 \pm 1,76 | 178,54 \pm 10,71 | 67,17 \pm 10,67 |
| T4 | 100 | 9,67 \pm 0,58 | 256,78 \pm 12,37 | 206,26 \pm 13,10 | 50,52 \pm 3,48 |
| T5 | 1000 | 10,00 \pm 0,00 | 251,16 \pm 32,18 | 197,73 \pm 25,26 | 53,43 \pm 7,77 |

Valores medios \pm DS (desviación estándar) de 3 experimentos

De los resultados que muestra la **Tabla 20** se puede concluir que, el tratamiento del suelo agrario de ensayo con OTC (5 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg OTC/kg suelo p.s.), no tiene efectos estadísticamente significativos sobre la lombriz de tierra *E. andrei* entre los distintos grupos de tratamiento y el grupo control a la finalización del ensayo (día 21). La concentración más alta para la que no se observa un efecto adverso (NOEC) en la lombriz de tierra a la finalización del ensayo (día 21) es de 1000 mg OTC/kg suelo p.s.

3.3. Efectos de oxitetraciclina en un sistema multi-especie en suelo

Como se ha indicado anteriormente, el sistema multi-especie en suelo (MS3: Multi Species Soil Systems), o sistema MS3, es un microcosmos terrestre que permite valorar, de forma simultánea, los efectos de los contaminantes sobre los tres grupos taxonómicos representativos del compartimento suelo (microorganismos, plantas e invertebrados terrestres).

Los resultados obtenidos en un sistema MS3, tras el tratamiento con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3) sobre la producción de CO₂ y actividad enzimática en el suelo, sobre la germinación y crecimiento de plantas mono- y dicotiledóneas (*T. aestivum*, *B. napus* y *V. sativa*), y sobre la toxicidad en invertebrados terrestres (*E. andrei*) son presentados a continuación.

3.3.1. Efectos sobre la producción de CO₂ y actividad enzimática del suelo

La **Tabla 21** presenta los parámetros fisicoquímicos humedad e iluminancia, la producción de CO₂ y la actividad enzimática deshidrogenasa de un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21).

Tabla 21. Contenido de humedad e iluminancia, producción de CO₂ y actividad enzimática deshidrogenasa de un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con oxitetraciclina (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21).

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | | Humedad (%) | Iluminancia (lux) | mg de CO ₂ producido/ 100 g suelo p.s./hora | Actividad deshidrogenasa (µg 1,3,5-trifenilformazan/g suelo p.s.) |
|--------------------------|------|-------------|-------------------|--|---|
| | | Día 21 | Día 21 | Día 21 | Día 21 |
| Control | 0 | 9,8 ± 2,7 | 1800 ± 125 | 1,30 ± 0,05 | 58,56 ± 7,71 |
| T1 | 0,86 | 12,2 ± 0,3 | 1617 ± 140 | 1,27 ± 0,06 | 60,82 ± 3,08 |
| T2 | 8,64 | 10,8 ± 1,4 | 1627 ± 178 | 1,15 ± 0,13*** (-11,73) ^a | 66,14 ± 9,84*** (12,94) ^a |
| T3 | 86,4 | 10,5 ± 0,4 | 1777 ± 188 | 1,12 ± 0,08*** (-14,45) ^a | 50,87 ± 5,43*** (-13,13) ^a |
| T4 | 864 | 10,7 ± 2,0 | 1690 ± 85 | 0,91 ± 0,06*** (-29,93) ^a | 37,45 ± 7,87*** (-36,05) ^a |

MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1)

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos estadísticamente significativos con respecto al control; *** $p < 0,001$

^aPorcentaje sobre el control

La **Tabla 21** muestra que la producción de CO₂ y la actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo de ensayo agrario tras el tratamiento con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3) se ve reducida significativamente de forma dosis-dependiente

3.3.2-Efectos sobre la germinación y crecimiento en plántulas terrestres mono- y dicotiledóneas (*Triticum aestivum*, *Brassica napus*, *Vicia sativa*)

Los efectos sobre la germinación y el crecimiento en plántulas de plantas superiores terrestres sembradas en un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,86; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21) se presentan en las **Tablas 22-24**.

Tabla 22. Efecto del tratamiento de oxitetraciclina sobre la germinación y el crecimiento de *T. aestivum*, en un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,86; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21).

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | | Plantas germinadas (número) | Longitud del tallo (cm) | Peso fresco del tallo (mg) |
|--------------------------|------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Control | 0 | 9,67 ± 0,58 | 34,3 ± 0,57 | 297,97 ± 12,26 |
| T1 | 0,86 | 9,33 ± 0,58 | 34,2 ± 0,58 | 296,11 ± 32,96 |
| T2 | 8,64 | 9,33 ± 1,15 | 32,3 ± 1,70 | 294,24 ± 42,48 |
| T3 | 86,4 | 9,67 ± 0,58 | 34,5 ± 2,83 | 289,27 ± 61,94 |
| T4 | 864 | 10,0 ± 0,00 | 34,6 ± 1,63 | 295,04 ± 47,14 |

Nota: al inicio del ensayo se sembraron 10 semillas de *T. aestivum* (día 0)
MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))
Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos

Tabla 23. Efecto del tratamiento de oxitetraciclina sobre la germinación y el crecimiento de *B. napus*, en un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,86; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21).

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | | Plantas germinadas (número) | Longitud del tallo (cm) | Peso fresco del tallo (mg) |
|--------------------------|------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Control | 0 | 10,00 ± 0,00 | 12,48 ± 0,77 | 115,60 ± 28,67 |
| T1 | 0,86 | 10,00 ± 0,00 | 11,97 ± 0,55 | 100,19 ± 7,47 |
| T2 | 8,64 | 9,67 ± 0,58 | 12,36 ± 1,28 | 111,56 ± 18,13 |
| T3 | 86,4 | 9,67 ± 0,58 | 11,91 ± 0,45 | 88,65 ± 3,60*** |
| T4 | 864 | 9,33 ± 1,15 | 10,85 ± 0,55 | 65,77 ± 9,77*** |

Nota: al inicio del ensayo se sembraron 10 semillas de *B. napus* (día 0)
MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))
Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos, estadísticamente significativos respecto al grupo control *** $p < 0,001$

La **Tabla 23** muestra los valores obtenidos para la planta dicotiledónea *Brassica napus* (colza) a los 21 tras el tratamiento de un suelo agrario de ensayo con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3). Para los parámetros número de plantas germinadas y longitud del tallo, no se observó efecto adverso alguno; sin embargo, sobre el peso fresco del tallo se observa que la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC), estadísticamente significativo ($***p<0,001$) frente al grupo control, es de 86,4 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 27,5 kg OTC/ha); la concentración más alta para la que no se observa efecto adverso (NOEC) es de 8,64 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 2,75 kg OTC/ha). Los efectos observados son dosis dependiente.

Tabla 24. Efecto del tratamiento de oxitetraciclina sobre la germinación y el crecimiento de *V. sativa*, en un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,86; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21).

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | | Plantas germinadas (número) | Longitud del tallo (cm) | Peso fresco del tallo (mg) |
|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Control | 0 | 9,33 ± 0,58 | 59,70 ± 3,19 | 421,90 ± 45,66 |
| T1 | 0,86 | 9,67 ± 0,58 | 55,10 ± 2,04 | 393,49 ± 63,21 |
| T2 | 8,64 | 10,00 ± 0,00 | 53,05 ± 1,30*** | 338,54 ± 27,25** |
| T3 | 86,4 | 9,67 ± 0,58 | 55,64 ± 0,49*** | 373,84 ± 12,42** |
| T4 | 864 | 9,33 ± 0,58 | 52,81 ± 3,08*** | 344,48 ± 32,83** |

Nota: al inicio del ensayo se sembraron 10 semillas de *V. sativa* (día 0)

MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos, estadísticamente significativos respecto al grupo control; $***p<0,001$

La **Tabla 24** muestra los valores obtenidos para la planta dicotiledónea *Vicia sativa* (veza o alverja) a los 21 tras el tratamiento de un suelo agrario de ensayo con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3). Con respecto al número de plantas germinadas no se observa ningún efecto adverso significativo. En el parámetro, longitud del tallo, se observa que la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC), estadísticamente significativo ($***p<0,001$) frente al grupo control, es de 8,64 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 2,75 kg OTC/ha) y la concentración para la que no se

observa efecto adverso (NOEC) es de 0,86 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 0,275 kg OTC/ha). Los efectos observados son dosis dependiente.

Sobre el peso fresco del tallo, ocurre lo mismo que con la longitud, la concentración más baja que produce un efecto adverso (LOEC), estadísticamente significativo ($***p<0,001$) frente al grupo control, es de 8,64 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 2,75 kg OTC/ha) y la concentración para la que no se observa efecto adverso (NOEC) es de 0,86 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 0,275 kg OTC/ha). Los efectos observados son dosis-dependiente.

3.3.3. Efectos sobre la mortalidad y biomasa en la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Los resultados del análisis de OTC en suelo y en la lombriz de tierra *E. andrei*, en un suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21) se presentan en las **Tablas 26 y 27**.

Tabla 25. Efectos sobre la lombriz de tierra *E. andrei*, al final del ensayo (día 21), tras el tratamiento de OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3), aplicado mediante riego en la superficie, a un suelo agrario de ensayo en sistema MS3.

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | | Lombriz de tierra <i>E. andrei</i> | | | |
|--------------------------------|------|------------------------------------|---------------------|----------------|-------------------------|
| | | Supervivencia (número) | Peso fresco (mg) | | Pérdida de peso (mg) |
| | | Día 21 | Día 0 | Día 21 | Día 21 |
| Control | 0 | 9,33 ± 0,58 | 360,07 ± 53,83 | 234,29 ± 57,56 | 125,78 ± 4,46 |
| T1 | 0,86 | 9,33 ± 0,58 | 319,12 ± 57,26 | 209,84 ± 62,82 | 109,29 ± 11,00 |
| T2 | 8,64 | 8,67 ± 0,58 | 361,61 ± 21,98 | 252,81 ± 9,15 | 108,81 ± 23,36 |
| T3 | 86,4 | 8,33 ± 0,58 | 326,14 ± 14,76 | 226,13 ± 4,59 | 100,01 ± 16,64 |
| T4 | 864 | 8,33 ± 0,58 | 331,93 ± 30,66 | 230,66 ± 24,02 | 101,27 ± 11,58 |

Nota: al inicio del ensayo se introdujeron 10 lombrices *E. andrei* (día 0)
MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))
Valores medios ± DS (desviación estándar) de 3 experimentos

Tabla 26. Concentraciones de oxitetraciclina en la superficie (primeros 2-5 cm) del suelo agrario de ensayo en sistema MS3 tras el tratamiento, aplicado mediante riego en la superficie, con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del ensayo (día 21)

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | µg OTC/g suelo p.s. al final del ensayo (día 21) | |
|---|---|------------------|
| T1 0,86 | 0,441 | 0,401 ± 0,060 |
| | 0,348 | |
| | 0,374 | |
| | 0,475 | |
| | 0,442 | |
| | 0,327 | |
| T2 8,64 | 4,835 | 4,688 ± 1,205 |
| | 2,581 | |
| | 6,044 | |
| | 5,029 | |
| | 5,453 | |
| | 4,184 | |
| T3 86,4 | 28,227 | 34,305 ± 7,119 |
| | 26,733 | |
| | 29,477 | |
| | 36,739 | |
| | 43,075 | |
| | 41,581 | |
| T4 864 | 259,868 | 267,346 ± 34,995 |
| | 233,212 | |
| | 250,571 | |
| | 269,960 | |
| | 256,125 | |
| | 334,339 | |

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 6 experimentos
MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))

Tabla 27. Concentraciones de oxitetraciclina en la lombriz de tierra *E. andrei*, al final del ensayo (día 21), tras el tratamiento de OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3), aplicado mediante riego en la superficie, a un suelo agrario de ensayo en sistema MS3.

| Tratamiento OTC (mg/MS3) | ng OTC/g p.f. de lombriz al final del ensayo (día 21) | |
|--------------------------------|--|------------------|
| T1 0,86 | < LOQ | < LOQ |
| T2 8,64 | 11,96 | 11,73 ± 4,39 |
| | 4,52 | |
| | 15,70 | |
| | 16,37 | |
| | 9,24 | |
| | 12,59 | |
| T3 86,4 | 1009,38 | 942,46 ± 156,36 |
| | 775,49 | |
| | 854,39 | |
| | 1045,47 | |
| | 1169,26 | |
| | 800,75 | |
| T4 864 | 6669,32 | 7365,17 ± 803,66 |
| | 6511,88 | |
| | 8430,64 | |
| | 7166,42 | |
| | 8258,39 | |
| | 7154,38 | |

Valores medios ± DS (desviación estándar) de 6 experimentos
MS3, 8 kg de suelo agrario de ensayo (mezcla suelo:arena (1:1))
p.f.: peso fresco

DISCUSIÓN

4. DISCUSION

Se ha descrito la presencia de residuos medioambientales de diversos tipos de antibióticos en el agua marina, terrestre y en el agua de los ríos provenientes del medio industrial farmacéutico, del medio hospitalario y de las granjas de producción animal incluyendo piscifactorías. Así, el antibiótico oxitetraciclina objeto de nuestro estudio, ya fue encontrado en sedimento a concentraciones en un rango de 0,1 -4,9 mg/kg materia seca (Jacobsen y Berglind, 1988), concentraciones que pueden causar efectos antimicrobianos. El riesgo de que cantidades sustanciales de principios activos de medicamentos a través de su utilización en medicina veterinaria, en medicina humana y como productos fitosanitarios pueden entrar en el medio ambiente (en sistemas acuáticos y terrestres) está totalmente documentado (Gavalchin y Katz, 1994; Hekloen et al., 1995; Holm *et al.*, 1995; Halling-Sorensen et al., 1998). El objetivo del presente trabajo fue por lo tanto presentar una evaluación del riesgo por la exposición medioambiental del antibiótico oxitetraciclina estudiando ensayos ecotoxicológicos apropiados.

En el presente estudio, hemos investigado la aplicabilidad de modelos de microcosmos experimentales para la evaluación del riesgo ecológico del medicamento veterinario oxitetraciclina, antibiótico de gran uso en medicina veterinaria y en medicina humana. A nuestro conocimiento en la literatura científica existen escasos datos sobre los efectos a la exposición del antibiótico oxitetraciclina en microcosmos. Estudios sobre diversos microcosmos se han realizado con medicamentos veterinarios, o con mezclas de medicamentos de uso veterinario y humano. Los microcosmos utilizados han sido descritos en detalle (Hanson et al., 2001). En el presente estudio se evalúa el efecto de la exposición a oxitetraciclina sobre diferentes compartimentos medioambientales que incluyen (1) planta acuática y medio de crecimiento, incluyendo la cinética; (2) lombriz de tierra *Eisenia andrei* en el medio suelo agrario, (3) sistema multiespecie suelo agrario, evaluando el efecto sobre microorganismos del suelo, sobre plantas terrestres y lombriz de tierra *Eisenia andrei*.

En nuestros resultados se observa que en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* a lo largo del experimento (7 días), la oxitetraciclina desaparece más bien lentamente, la semivida de eliminación es dosis-dependiente, así para el tratamiento más alto de oxitetraciclina (16 µg/ml) la semivida de eliminación fue de 5,25 días, semivida superior a la observada de 2,74 días tras dosis de oxitetraciclina de 0,3 µg/ml por Brain *et al.* (2005) experimento realizado también en un medio microcosmo acuático. Sin embargo la semivida de 5,25 días obtenida en nuestro estudio es comparable a la descrita de 4 días por Doi y

Stoskopf (2000). Se conoce que en medio acuoso, las tetraciclinas tienen una limitada estabilidad (Halling-Sorensen et al., 2002) y productos epimeros pueden ser formados por hidrólisis o fotólisis (Halling-Sorensen et al., 2003), aunque la fotólisis está considerada como el principal proceso por el que las tetraciclinas se degradan (Oka et al., 1989). Las altas temperaturas, alta exposición a la luz, alto pH y presencia de materia orgánica todos ellos incrementan la velocidad de degradación de la oxitetraciclina en solución (Doi y Stoskopf, 2000). En el presente trabajo observamos que la temperatura, iluminancia y conductividad eléctrica del medio acuático no mostraron variabilidad a lo largo de todo el experimento que pudiera afectar al crecimiento de la planta, resultado que concuerda con el descrito por Brain et al. (2005).

La planta acuática *L. minor* es una especie recomendada para ensayos de fitotoxicidad acuática (Wang, 1990a,b; Wang y Williams, 1988,1990). La planta *L. minor* es una planta vascular pequeña, que crece rápidamente, es fácil de cultivar y es sensible a una gran variedad de tóxicos a concentraciones muy pequeñas en la solución de ensayo (Einhellig et al., 1985; Taraldsen y Norberg-King, 1990;). Existen 2 respuestas o parámetros importantes para establecer los efectos de una sustancia sobre el crecimiento vegetativo de la planta acuática *L. minor* (OECD, 2006d). Estos parámetros deben ser medidos por la tasa de crecimiento, respuesta que es variable en base a los cambios en el número de frondas, su peso fresco y seco expresado por día (Huebert y Shay, 1993; Christen y Theuer, 1996). El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición de la tasa de crecimiento en base al número de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el LOEC fue de 2 µg OTC/ml, y el NOEC fue 1 µg OTC/ml. Los resultados obtenidos sobre la tasa de crecimiento de la planta acuática *L. minor* en base al peso fresco y seco de las frondas, al final del ensayo (día 7), paralelamente demostraron una inhibición del crecimiento de la planta acuática *L. minor*, estableciéndose un LOEC fue de 1 µg OTC/ml y no se pudo establecer un NOEC. La EC10 para la tasa de crecimiento en relación con el número de frondas, y su peso fresco y seco alcanzo valores de 0,50; 0,57 y 0,33 µg OTC/ml, respectivamente.

También se establecen efectos de una sustancia sobre el crecimiento vegetativo de la planta acuática *L. minor* (OCDE, 2006d) en base a dos variables, número de frondas y otra medida tal como peso fresco y seco del número de frondas respecto, parámetro conocido como rendimiento. El tratamiento con oxitetraciclina > 2 µg OTC/ml en el medio de crecimiento al final del ensayo (día 7) originó un efecto letal de la planta (frondas con

necrosis, clorosis, rotura de las colonias y pérdida de flotabilidad), siendo el LOEC 1 µg OTC/ml, no pudiéndose establecer un NOEC. Con respecto a la segunda variable, la más sensible fue el peso seco con un LOEC 1 µg OTC/ml, y tampoco se pudo establecer un NOEC. La EC10 para el rendimiento en base al número de frondas, y su peso fresco y seco alcanzo valores de 1,36; 0,32 y 0,21 µg OTC/ml, respectivamente.

El ensayo aplicado con la planta acuática *L. minor* nos proporciona datos de ecotoxicidad muy valorables ya que existe evidencia que es una planta muy sensible a numerosos tipos de agentes químicos comparable con los datos que podríamos obtener en algas incluso más sensibles ya que en los ensayos con algas se requiere una filtración del medio acuoso antes del inicio del experimento que pudiera conllevar una pérdida del agente químico a estudio (Wang, 1990). Teniendo en cuenta los datos obtenidos en base a la tasa de crecimiento y el rendimiento vegetativo de la planta *L. minor* se sugieren diferentes parámetros aplicables al análisis del impacto ambiental de la oxitetraciclina (Tabla 18). El riesgo medioambiental está basado en la razón PEC/PNEC. El riesgo se clasifica específicamente como: (1) insignificante si la razón PEC/PNEC es $< 0,1$; (2) riesgo bajo si PEC/PNEC está en el rango de 0,1-1; (3) riesgo moderado si PEC/PNEC está en un rango de 1-10; (4) riesgo alto si PEC/PNEC > 10 (Stockholms läns Landsting, 2012).

En numerosas ocasiones se impulsan las evaluaciones medioambientales con ensayos sobre el medio terrestre además de los ensayos en el medio acuático (EMEA, 2003), en particular cuando se evalúa el análisis del riesgo de antibióticos sobre organismos terrestres (Zhou et al., 2007; Kwon-Rae et al., 2011). La lombriz de tierra es uno de los más importantes invertebrados en los ecosistemas del suelo, y está altamente afectada por los contaminantes del suelo. Las especies *Eisenia*, en general, están consideradas como un organismo modelo para la vigilancia medioambiental de agentes químicos y se utilizan comúnmente en los ensayos ecotoxicológicos agudos y crónicos (ISO, 1998). En el presente trabajo, el tratamiento de oxitetraciclina en el suelo agrario (dosis única de aplicación de 0,1; 1, 10, 100 y 1000 mg OTC/kg suelo p.s.) no originó ninguna mortalidad sobre la lombriz de tierra *E. andrei* tras 21 días de la exposición; tampoco afectó el peso fresco, ni originó pérdida de peso de la *E. andrei*, por lo que se puede establecer un NOEC de 1000 mg OTC/kg suelo p.s. Nuestros resultados son paralelos al observado para la clortetraciclina por Lin et al. (2012), quienes tampoco observaron mortalidad a dosis de 0,3; 3, 30, 100 y 300 mg/kg suelo p.s., pero estos investigadores realizaron un estudio de toxicidad sobre la reproducción y en este segundo estudio efectos significantes se presentan con dosis > 100 mg clortetraciclina/kg suelo p.s.

Finalmente, nuestro trabajo aborda los efectos de la oxitetraciclina en un sistema multi-especie en suelo con el fin de valorar de forma simultánea, los efectos de la oxitetraciclina sobre los tres grupos taxonómicos representativos del compartimento suelo: microorganismos, plantas e invertebrados terrestres. La evaluación de la funcionalidad de los potenciales microorganismos presente en el suelo agrario de ensayo se evaluó mediante la determinación de la producción de CO₂ y la actividad de la enzima deshidrogenasa, observándose que tras el tratamiento con OTC (4 tratamientos: dosis única de aplicación de 0,8; 8; 86; y 864 mg/sistema MS3) se vieron reducidas significativamente de forma dosis-dependiente. En el sistema MS3 microcosmo también se determinó el efecto del tratamiento de oxitetraciclina en el suelo sobre la germinación y el crecimiento de tres plantas terrestres *T. aestivum*, *B. napus* y *V. sativa*. El mayor efecto observado fue para las plantas dicotiledóneas *B. napus* y *V. sativa* a nivel de la longitud y del peso fresco del tallo. La planta mas sensible fue *V. sativa* con un LOEC de 8,64 mg OTC/sistema MS3 equivalente a 2,75 kg OTC/ha y un NOEC de 0,86 mg OTC/sistema MS3 equivalente a 0,275 kg OTC/ha. Existe información detallada en la literatura científica del efecode las tetraciclinas sobre el crecimiento y desarrollo de plantas. Estudios realizados con la planta *Phaseolus vulgaris* (guisante) se observó que los antibióticos clortetraciclina y oxitetraciclina disminuyen el crecimiento y el desarrollo de la planta a dosis de 10 µg/ml en solución (Bathelder, 1981, 1982), valores comparables con los obtenidos en este estudio con la planta *V. sativa* (8,64 mg OTC/sistema MS3 equivalente a 28 µg/ml).

Aunque en general los antibióticos, como las tetraciclinas tienen una relativamente corta semivida medioambiental, pero desafortunadamente estos se están continuamente introduciendo en el medio ambiente (Winckler y Grafe, 2001). La persistencia y la actividad biológica de los antibióticos en el medioambiente potencialmente pueden originar efectos adversos a organismos no-diana (Zhu, 2009). En el presente trabajo se pone en evidencia que tratamientos de oxitetraciclina en un suelo agrario originan un riesgo ecológico potencial de acumulación en el suelo afectando los organismos terrestres. Dosis única de aplicación mediante riego de 864 mg OTC/8 kg de suelo, equivalente a 108 µg OTC/g de suelo, a los 21 días de la exposición se encuentran en la lombriz de tierra niveles de alrededor de 8 µg OTC/g peso fresco de lombriz *E. andrei*, y niveles de 267 µg OTC/g de suelo, lo que indica que la oxitetraciclina se acumula en la superficie sin sufrir movilidad lo que representa riesgo de contaminación para la cadena alimentaria. (Kumar *et al.*, 2005a,b)

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se determinan los **efectos de la exposición a oxitetraciclina (OTC)** sobre diferentes compartimentos medioambientales que incluyen (1) planta acuática *Lemna minor* y medio de crecimiento, incluyendo la cinética de OTC en el medio de crecimiento de la planta acuática; y (2) lombriz de tierra *Eisenia andrei* en el medio suelo agrario, y (3) sistema multi-especie suelo agrario, evaluando el efecto sobre **los tres grupos taxonómicos representativos del compartimento suelo (microorganismos, plantas e invertebrados terrestres)**

Efectos sobre la planta acuática *Lemna minor*

1. Después del tratamiento con oxitetraciclina en el medio de crecimiento de la planta acuática (5 tratamientos: dosis de aplicación única de 1, 2, 4, 8, y 16 µg OTC/ml), las concentraciones de oxitetraciclina en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* desaparecen lentamente de este de forma monoexponencial, dosis-dependiente, siendo la semivida de eliminación de 5,25 días para la concentración más alta de oxitetraciclina (16 µg/ml).
2. La concentración de oxitetraciclina en el medio de crecimiento definida en µg/ml como concentración media a lo largo del periodo de ensayo (7 días) fue de 10,23 µg/ml para la concentración más alta de oxitetraciclina (16 µg/ml).
3. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición de la tasa de crecimiento en base al número de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 2 µg OTC/ml, LOEC fue de 2 µg OTC/ml, el NOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC fue de 0,1 µg OTC/ml (aplicando un factor de seguridad 10) y PEC/PNEC 20.
4. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición de la tasa de crecimiento en base al peso fresco de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 1 µg OTC/ml, LOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC de 0,03 µg OTC/ml (aplicando a la LOEC un factor de seguridad de 30) y PEC/PNEC de 33.

5. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición de la tasa de crecimiento en base al peso seco de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 1 µg LOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC fue de 0,03 µg OTC/ml (aplicando a la LOEC un factor de seguridad de 30) y PEC/PNEC de 33.
6. La EC₁₀ para la tasa de crecimiento en relación con el número de frondas, y su peso fresco y seco alcanzo valores de 0,50; 0,57 y 0,33 µg OTC/ml, respectivamente.
7. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición del rendimiento en base al número de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 1 µg OTC/ml, LOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC fue de 0,03 µg OTC/ml (aplicando un factor de seguridad 30) y PEC/PNEC de 33.
8. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición del rendimiento en base al peso fresco de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 2 µg OTC/ml, LOEC fue de 2 µg OTC/ml, NOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC fue de 0,1 µg OTC/ml (aplicando un factor de seguridad de 10) y PEC/PNEC de 33.
9. El tratamiento con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml) en el medio de crecimiento de la planta acuática *L. minor* originó de forma dosis-dependiente una inhibición del rendimiento en base al peso seco de frondas. En el día 7 del experimento (día de finalización del ensayo) el PEC fue 1 µg LOEC fue de 1 µg OTC/ml, PNEC fue de 0,03 µg OTC/ml (aplicando a la LOEC un factor de seguridad de 30) y PEC/PNEC de 33.
10. La EC₁₀ para el rendimiento en base al número de frondas, y su peso fresco y seco alcanzo valores de 1,36; 0,32 y 0,21 µg OTC/ml, respectivamente.

Efectos sobre la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

11. El tratamiento del suelo agrario de ensayo con oxitetraciclina, a las distintas dosis única de aplicación (0,1; 1; 10; 100 y 1000 mg OTC/kg suelo p.s.) no originó efectos adversos sobre la lombriz de tierra *E. andrei*. Al final del experimento (día 21 del ensayo) el NOEC fue de 1000 mg OTC/kg suelo p.s.

Efectos sobre el sistema multi-especie en suelo (MS3): Efectos sobre los tres grupos taxonómicos representativos del compartimento suelo (microorganismos, plantas e invertebrados terrestres)

12. El tratamiento con OTC a las distintas dosis única de aplicación (0,8; 8; 86; y 864 mg OTC/sistema MS3) al final del experimento (día 21 del ensayo) originó de forma dosis-dependiente, una reducción de la producción de CO₂ y de la actividad enzimática deshidrogenasa.

13. La germinación y crecimiento en plántulas terrestres dicotiledóneas (*Brassica napus* y *Vicia sativa*) se vieron afectados por la exposición de OTC aplicada por riego en la superficie del suelo agrario (dosis única de aplicación de 0,86; 8,64; 86,4 y 864 mg OTC/sistema MS3) principalmente a nivel de la longitud y del peso fresco del tallo. La planta más sensible fue *V. sativa* con un LOEC de 8,64 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 2,75 kg OTC/ha) y un NOEC de 0,86 mg OTC/sistema MS3 (equivalente a 0,275 kg OTC/ha)

14. El presente trabajo pone en evidencia que tratamientos de oxitetraciclina en un suelo agrario originan un riesgo ecológico potencial de acumulación en el suelo afectando los organismos terrestres. Dosis única de aplicación mediante riego de 864 mg OTC/8 kg de suelo, equivalente a 108 µg OTC/g de suelo, a los 21 días de la exposición se encuentran en la lombriz de tierra concentraciones de alrededor de 8 µg OTC/g peso fresco de lombriz *E. andrei*, y en el suelo concentraciones de 267 µg OTC/g de suelo, lo que indica que la oxitetraciclina se acumula en la superficie sin sufrir movilización lo que representa un riesgo de contaminación para la cadena alimentaria

15. El presente trabajo también analiza la metodología implicada en la evaluación del riesgo medioambiental requerida para reconocer efectos dosis-repuesta que puede ayudar a la caracterización del riesgo,

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agwuh K.N., Macgowan A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(2): 256-265.
- Ahart J.G., Burton G.C., Blenden D.C. (1978). The influence of antimicrobial agents on the percentage of tetracycline-resistant bacteria in faeces of humans and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 44(2): 183-190.
- Anderson J.P.E. and Domsch K.H. (1978). A physiological method for measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 215-221
- Asheshov E.H. (1975). The genetics of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 88(1): 132-140.
- Baeyens J.M., del Pozo E. (2008). Antibióticos aminoglucósidos. Tetraciclinas y cloranfenicol. En: Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica* (18ª Ed.). Lorenzo, O., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A. y Portolés, A. (Eds.), Médica Panamericana, Buenos Aires - Madrid, pp. 832-836.
- Ball P.R., Shales S.W., Chopra I. (1980). Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93(1): 74-81.
- Bandin I., Santos Y., Toranzo A.E., Barja J.L. (1991). MICs and MBCs of chemotherapeutic agents against *Renibacterium salmoninarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(5): 1011-1013.
- Baquero F., Martínez J.L., Canton R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260-265
- Batchelder A.R. (1981). Chlortetracycline and oxytetracycline on plant growth and development in liquid cultures. *Journal of Environmental Quality* 10(4): 515-518
- Batchelder A.R. (1982). Chlortetracycline and oxytetracycline on plant growth and development in soil systems. *Journal of Environmental Quality* 11(4): 515-518
- Benbough J.E., Morrison G.A. (1967). Molecular basis of an inhibition by tetracyclines. *Journal of General Microbiology* 49: 469-485.

- Bentorcha F., de Cespedes G., Horaud T. (1991). Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(5): 808-812.
- Bhattacharya M., Parakh A., Narang M. (2009). Tigecycline. *Journal of Postgraduate Medicine* 55(1): 65-68.
- Bhattacharyulu Y., Singh A. (1988). Chemoprophylactic activity of terramycin against *Theileria annulata* infection a preliminary report. *Livestock Adviser* 13(3): 35-37.
- Bianchi A., Scieux C., Robache S., Vassias I., Perol Y. (1991). Comparative study of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) values for tetracycline, monocyline, erythromycin and rokitamycin against eleven strains of *Chlamydia trachomatis*. *Pathologie et Biologie* 39(5): 442-445.
- Björndahl G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (Lemnaceae family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- Blackwell P.A., Holten Lützhøft H.C., Mab H.P., Halling-Sørensen B., Boxall A.B.A., Kay P. (2004a). Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64: 1058–1064.
- Blackwell P.A., Holten Lützhøft H.C., Mab H.P., Halling-Sørensen B., Boxall A.B.A., Kay P. (2004b). Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography–UV detection. *Journal of Chromatography A* 1045: 111–117
- Bodley J.W., Zieve F.J. (1969). On specificity of two ribosomal binding sites: studies with tetracycline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 36(3): 463-468
- Boleas S., Alonso C., Pro J., Babín M.M., Fernández C., Carbonell G., Tarazona J.V. (2005a). Effects of sulfachlorpyridazine in MS-3-arable land: A multispecies soil system for assessing the environmental fate and effects of veterinary medicines. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 811–819
- Boleas S., Alonso C., Pro J., Fernández C., Carbonell G., Tarazona J.V. (2005b). Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS-3) and influence of manure co-addition. *Journal of Hazardous Materials* 122: 233–241

- Boscher A., Guignard C., Pellet T., Hoffmann L., Bohn T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 6394–6404.
- Bouché M.B. (1972). Lombriciens de France. Écologie et Systématique. INRA Publ. Ann. Zool. Ecol. Anim. (No. hors-serie) 72-2: 671pp.
- Boxall A.B.A., Fogg L.A., Blackwell P.A., Kay P., Pemberton E.J., Croxford A. (2004). Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 180: 1- 91
- Brain R.A., Wilson C.J., Johnson D.J., Sanderson H., Bestari K., Hanson M.L., Sibley P.K., Solomon K.R. (2005). Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms. *Environmental Pollution* 138: 425-442
- Brodie T.A., Holmes P.H., Urquhart G.M. (1988). Prophylactic use of long-acting tetracycline against tick borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) in sheep. *Veterinary Record* 122(2): 43-44.
- Browning A., Carter S.D., Barnes A., May C., Bennett D. (1993). Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Veterinary Record* 132(24): 610-611.
- Bruun M.S., Schmidt A.S., Madsen L., Dalsgaard I. (2000). Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* 187(3-4): 201-212.
- Burch D.G.S., Valks M. (2002). Comparison of minimal inhibitory concentration (MIC) against chicken *Mycoplasma* of tiamulin and other antimicrobials and their concentrations in the blood. In: *Proceedings of the XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt*, p. 322.
- Burdett V. (1980). Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus Agalactiae* (Group-B). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 18(5): 753-760.
- Burdett V. (1986). Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein-synthesis. *Journal of Bacteriology* 165(2): 564-569.
- Burdett V., Inamine J., Rajagopalan S. (1982). Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology* 149(3): 995-1004.

- Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology. Volume 1. Blackwell Scientific Publications, Inc. ISBN 0-632-03573-0
- CAM, 2015. Comunidad de Madrid. Suelos contaminados. http://www.madrid.org/cs/Satellite?idTema=1109265600870&c=CM_InfPractica_FA&pagename=ComunidadMadrid%2FEstructura&sm=1&language=es&cid=1114178591774&segmento=1 (último acceso 30/07/2015)
- Cannon J. B., Sparling P.F. (1984). The genetics of the gonococcus. *Annual Review of Microbiology* 38, 111-133.
- Carbonell G., Pablos M.V., García P., Ramos C., Tarazona J.V. (1998a). Desarrollo de ensayos rápidos y de bajo coste para detectar el efecto de la contaminación sobre los microorganismos del suelo. *Cuadernos de Investigación Biológica* 20: 39-42. ISSN 0211-5700
- Carbonell G.; Pablos M.V., Ortiz J.A., Ramos C., Tarazona J.V. (1998b). Desarrollo de un sistema terrestre miniaturizado para valorar el comportamiento y los efectos de las sustancias químicas en suelos. *Cuadernos de Investigación Biológica* 20: 141-144. ISSN 0211-5700
- Castillo J.R.E., Elsner J., Martineau P. (1998). Pharmacokinetic modelling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *Swine Health and Production* 6(5): 189-202.
- Cattoir V., Poirel L., Aubert C., Soussy C.J., Nordmann P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental. *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases* 14: 231-237
- CE (2015). Comunicación de la Comisión. Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04) (DOUE C 299, 11.9.2015)
- CE, 1972. Carta Europea de los Suelos, aprobada por el Consejo de Europa en 1972
- CE, 2002. Comunicación de la Comisión Europea COM(2002) 179, “Hacia una estrategia temática para la protección del suelo”.
- CE, 2006. Comunicación de la Comisión Europea COM(2006) 231, “Estrategia temática para la protección del suelo”

- Chopra I. (1988). Molecular mechanism involved in the transport of antibiotics into bacteria. *Parasitology* 96(Suppl): 25-44.
- Chopra I., Howe T.G. (1978). Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiological Reviews* 42(4): 707-724.
- Chopra I., Lacey R.W., Connolly J. (1974). Biochemical and genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 6(4): 397-404.
- Chopra I., Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(2): 232-260.
- Christen O., Theuer C. (1996). Sensitivity of *Lemna* bioassay interact with stock-culture period. *Journal of Chemical Ecology* 22(6): 1177-1186.
- Christiansson A., Mardh P.A. (1983). Tetracycline resistance in *Mycoplasma hominis*. *Sexually Transmission Diseases* 10(Suppl 4): 371-373.
- Cohen R.O., Bernstein M., Ziv G. (1995). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Actinomyces pyogenes* recovered from the uterus of dairy-cows with retained fetal membranes and post parturient endometritis. *Theriogenology* 43(8): 1389-1397.
- Cohen R.O., Colodner R., Ziv G., Keness J. (1996). Isolation and antimicrobial susceptibility of obligate anaerobic bacteria recovered from the uteri of dairy cows with retained fetal membranes and postparturient endometritis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 43(4): 193-199.
- Colaizzi J.L., Klink P.R. (1969). Ph-partition behavior of tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58(10): 1184-1189.
- Conover L.H. (1953). Terramycin. XI. The synthesis of indanone degradation products of terramycin. *Journal of the American Chemical Society* 75(16): 4017-4020.
- Convención de Lucha contra la Desertificación y la Sequía (1994)
- Cooper A.C., Fuller J.R., Fuller M.K., Whittlestone P., Wise D.R. (1993). In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary. *Research in Veterinary Science* 54(3): 329-334.

- Davies J.E. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found. Symp. CIBA Foundation Symposia* 207: 15-27
- de Siqueira J.M., Carvalho S., Paniago E.B., Tosi L., Beraldo H. (1994). Metal complexes of anhydrotetracycline. I: A spectrometric study of the Cu(II) and Ni(II) complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83(3): 291-295.
- Decisión 1600/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2002, por la que se establece el Sexto Programa de Acción Comunitario en Materia de Medio Ambiente
- Decisión 1982/2006/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativa al Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea para acciones de investigación, desarrollo tecnológico y demostración (2007 a 2013)
- Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
- Directiva 2004/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril de 2004, sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales.
- Directiva 2004/73/CE de la Comisión de 29 de abril de 2004 por la que se adapta, por vigésima novena vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas.
- Directiva 92/18/CEE de la Comisión, de 20 de marzo de 1992, por la que se modifica el anexo de la Directiva 81/852/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre normas y Protocolos analíticos, toxicofarmacológicos y clínicos en materia de pruebas de medicamentos veterinarios.
- Doi A.M., Stoskopf M.K. (2000). The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate and organic matter. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 246-253.

- ECB (2003). European Chemical Bureau. Technical Guidance Document on Risk Assessment, in support of: Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances; Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances; Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. Institute for Health and Consumer Protection.
- Einhellig F.A., Leather G.R., Hobbs L.L. (1985). Use of *Lemna minor* L. as a bioassay in allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 11: 65-72
- EMA (1999a). Antibiotic Resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative Risk Assessments by the Committee for Veterinary Medicinal Products. EMA/CVMP/342/99-corr-Final. 14 July 1999.
- EMA (2000). Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products – Phase I (VICH Topic GL6. Ecotoxicity Phase I). European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). CVMP/VICH/592/98-final
- EMA (2003). Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP) Guideline on Environmental Impact Assessment for veterinary medicinal products Phase II. VICH GL 38 (ECOTOXICITY PHASE II). CVMP/VICH/790/03-FINAL
- EPA (2008a). United States Environmental Protection Agency. Problem Formulation for the Environmental Fate, Ecological Risk, Endangered Species, and Drinking Water Assessments in Support of the Registration Review for Oxytetracycline. August 13, 2008. EPA-HQ-2008-0686-0004
- EPA (2009). EPA-HQ-OPP-2008-0686-0016. Oxytetracycline Final Work Plan Registration Review. May 2009.
- Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(2): 266-270.

- Ewgu G.O. (1992). *In vitro* sensitivity of *Mycoplasma conjunctivae* and some bacterial specie causing ovine infection keratoconjunctivitis. *Small Ruminant Research* 7(1): 85-92.
- Fairbrother A., Glazebrook P.W., van Straalen N., Tarazona J. (2002). Test methods for hazard determination of metals and sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL.
- Fajardo A., Martinez J.L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion In Microbiology* 11: 161-167
- FAO (1981). Carta Mundial de los Suelos.
- FAO (2011). Payments for Ecosystem Services and Food Security. ISBN 978-92-5-106796-3
<http://www.fao.org/docrep/014/i2100e/i2100e.pdf>
- FAO (2015a) El suelo es un recurso no renovable
<http://www.fao.org/documents/card/es/c/0cd51fed-61de-4780-ba88-234645fac56b/>
(último acceso 30/07/15)
- FAO (2015b). 2015 Año Internacional de los Suelos. Suelos sanos para una vida sana.
<http://www.fao.org/soils-2015/news/news-detail/es/c/277721/>(último acceso 30/07/15)
- Fernández C., Alonso C., Babin M.M., Pro J., Carbonell G., Tarazona J.V. (2004). Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. *Science of the Total Environment* 323: 63-69.
- Fernández M.D., Cagigal E., Vega M.M., Urzelai A., Babín M., Pro J., Tarazona J.V. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 174-184
- Forbes V.E., Forbes T.L. (1994). *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, London. ISBN 0-412-43530-6
- Franke A.E., Clewell D.B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology* 145(1): 494-502.
- Franklin T.J., Higginson B. (1970). Active accumulation of tetracycline by *Escherichia Coli*. *Biochemical Journal* 116(2): 287-297.
- Freeman C., Liska G., Ostle N.J., Jones S.E., Lock M.A. (1995). The use of fluorogenic substrates for measuring enzyme activity in peatlands. *Plant and Soil* 175: 147-152.

- Gale E.F., Folkes J.P. (1953). The assimilation of aminoacids by bacteria. Action of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* 53: 493-498.
- Gans E.H., Higuchi T. (1957). The solubility and complexing properties of oxytetracycline. I. Interaction in aqueous solution. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 46(8): 458-466.
- Gavalchin J., Katz, S.E. (1994). The persistence of fecal borne antibiotics in soil. *IAOAC International* 77: 481-485
- Goldstein F.W., Dang Van A., Bouanchaud D.H., Acar J.F. (1978). Evolution de la resistance aux antibiotiques des pneumocoques et répartition de les types capsulaires. *Pathologie et Biologie* 26: 173-180.
- Halling-Sørensen B., Jensen J., Tjørnelund J., Montforts M.H.M.M. (2001). Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues in Danish agriculture. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the environment*. 2001. Germany, Springer Verlag
- Halling-Sørensen B., Lykkeberg A., Ingerslev F., Blackwell P., Tjørnelund J. (2003). Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere* 50: 1331-1342
- Halling-Sørensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lützhøft H.C.H (1997). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere* 36: 357 – 393
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. –A Review. *Chemosphere* 36(2): 357-393
- Halling-Sørensen B., Sengeløv G., Tjørnelund J. (2002). Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 263-271

- Hamscher G., Abu-Quare A. (2000a). Determination of tetracyclines and tylosin in soil and water samples from agricultural areas in lower Saxony. van Ginkel LA, Ruitr A (eds). *Proceedings of the Euroresidue IV Conference*, Veldhoven, Netherlands, 8-10 May 2000. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Netherlands: 522-526
- Hamscher G., Sczesny S., Abu-Qare A., Hoper H., Nau H. (2000b). Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 107: 332-334.
- Hamscher G., Sczesny S., Nau H. (2000c). Tetracycline and chlortetracycline residues in soil fertilized with liquid manure. *Proceedings of Livestock Farming and the Environment*, Hannover, Germany, 28-29 September. Hartung J, Whates C. (eds), pp. 27-31.
- Hanson M.L., Sibley P.K., Mabury S.A., Muir D.C., Solomon K. (2001). Chlorodifluoroacetic acid fate and toxicity to the macrophytes *Lemna gibba*, *Myriophyllum spicatum*, and *Miriophyllum sibiricum* in aquatic microscosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2578-2758
- Hartman E.G., Geryl J. (1993). Comparison between the minimal inhibitory concentration of tilmicosin and oxytetracycline for bovine pneumonic *Pasteurella haemolytica* isolates. *Veterinary Quaterly* 15(4): 184.
- Hash J.H., Wishnick M., Miller P.A. (1964). On mode of action of tetracycline antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 239(6): 2070-2078.
- Hillman W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review* 27: 221-287
- Hirsch H.A., Finland M. (1960). Comparative activity of four tetracycline analogues against pathogenic bacteria in vitro. *American Journal of the Medical Sciences* 239: 288-294.
- Holm J.V., Rugge K., Bjerg P.L., Christensen T.H. (1995). Ocurrance and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grisnted, Denmark). *Environmental Science & Technology* 29(5): 1415-20

- Hopf G., Bocker R., Estler C.J. (1988). The influence of tetracyclines on the aggregation of free and membrane-bound polysomes and on the RNA content of the liver of mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338(4): 455-458.
- Horodniceanu T.H., Delbos F.R. (1980). Les streptocoques du groupe D dans les infections humaines: identifications et sensibilité aux antibiotiques. *Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie* 131B(2): 131-144.
- Huebert D.B., Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 481-483
- Inamoto T., Kikuchi K., Iijima H., Kawashima Y., Nakai Y., Ogimoto K. (1994). Antibacterial activity of tilmicosin against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lesions in swine. *Journal of Veterinary Medical Science* 56(5): 917-921.
- Inglis V., Richards R.H. (1991). The *in vitro* susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents. *Journal of Fish Diseases* 14: 614-650.
- Isaeva L.M., Voeikova T.A. (1990). Development of the system for protoplast regeneration in *Streptomyces aureofaciens* strains chlortetracycline producers. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 35(12): 26-29.
- ISO (International Standard Organization) (1996).. Soil quality -- Vocabulary -- Part 1: Terms and definitions relating to the protection and pollution of the soil. ISO, Geneva. Standard Number No 11074-1
- ISO (International Standard Organization) (1998). Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part II. Method for the determination of effects on reproduction. ISO, Geneva. Standard Number No. 11268-2
- Izaki K., Arima K. (1963). Disappearance of oxytetracycline accumulation in the cells of multiple drug-resistant *Escherichia coli*. *Nature* 200: 384-385.
- Jacobsen P., Berglind L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 70: 365-370.
- Jacobsen P., Berglind L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 70: 365-370.

- Janata J., Mikulik K. (1995). Translation initiation factors of a tetracycline producing strain of *Streptomyces aureofaciens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208(2): 569-575.
- Johannesburgo, 2002. Tercera Cumbre Mundial de las Naciones Unidas sobre Ambiente y Desarrollo. Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible. Johannesburgo (Sudáfrica) del 2 al 4 de septiembre de 2002.
- Kamiya T., Kubota K., Yamamoto K., Komuro M., Kakefuda S., Murakami R., Ichijo G., Miyoshi Y. (1987). Enterotoxigenicity and tetracycline resistance of *Clostridium perfringens* isolated from chicken. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 28(3): 175-179.
- Khan N.H., Roets E., Hoogmartens J. (1996). Comparison of several types of poly (styrene-divinylbenzene) copolymer for the analysis of oxytetracycline and doxycycline by HPLC. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(2): 7-13.
- Kinjo T., Machida S. (1973). Sensitivity of *Erysipelothrix insidiosa* strains to antibiotics and trials of artificial induction of penicillin resistant strains *in vitro*. *Science Bulletin of the College of Agriculture University of the Ryukyus Okinawa* 20: 335-341.
- Kiorpes A.L., Backstrom L.R., Collins M.T., Kruse G.O. (1989). Comparison of conventional and long-acting oxytetracyclines in prevention of induced *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of growing swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53(4): 400-404.
- Kozlova E.V., Boronin A.M. (1985). Tetracycline resistance controlled by plasmids of *Pseudomonas aeruginosa* with a wide spectrum of bacterial hosts. *Antibiotiki i meditsinskaia biotekhnologiia* 30(2): 83-86.
- Kumar K., Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander I., Rosen C.J. (2005a). Antibiotic uptake from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 34: 2082-2085.
- Kumar K., Gupta S.C., Chander Y., Singh A.K. (2005b). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances In Agronomy* 87: 1-54
- Kümmerer K. (2001) Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. (2)
- Kümmerer K. (Editor). (2005). Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks. Third, revised and enlarged edition. ISBN: 978-3-540-74663-8

- Kurt H., Stezowski J. (1976). Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 2. Coordination and conformational aspects of oxytetracycline metal ion complexation. *Journal of the American Chemical Society* 98(19): 6018-6026.
- Kwon S.Y., Cho D.H., Lee S. Y., Lee K., Chong Y. (1994). Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* isolated from blood and synovial fluid. *Yonsei Medical Journal* 35(3): 314-319.
- Kwon-Rae K., Gary O., Soon-Ik K., Deog-Bae L., Yong S.O. (2011). Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air and Soil Pollution* 214: 163-174
- Lambs L., Venturini M., Decocklereverend B., Kozlowski H., Berthon G. (1988). Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids: Part 8. Potentiometric and spectroscopic studies on the formation of Ca(II) and Mg(II) complexes with 4-dedimethylamino-tetracycline and 6-desoxy-6-demethyl-Tetracycline. *Journal of Inorganic Biochemistry* 33(3): 193-210.
- Landolt E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
- Last J.A. (1969). Studies on binding of tetracycline to ribosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208(2): 569-575.
- Lee D.H., Miles R.J., Inal J.R. (1987). Antibiotic sensitivity and mutation rates to antibiotic resistance in *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*. *Epidemiology and Infection* 98(3): 361-368.
- Lefebvre J.C., Gauber E., Lareng M.B. (1991). First isolation in France of a penicillinase-non producing *Neisseria gonorrhoeae* with high level tetracycline resistance. *Pathologie et Biologie (Paris)* 39(5): 491-494.
- Levy S.B. (1989). Evolution and spread of tetracycline resistance determinants. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 24(1): 1-3.
- Levy S.B. (1998). Multidrug resistance - A sign of times. *New England Journal of Medicine* 338: 1376-1378.
- Levy S.B., Fitzgerald G.B., Macone A.B. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *New England Journal of Medicine* 295(11): 583-588.

- Levy S.B., McMurry L. (1978). Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 276(2): 90-92.
- Lin D., Zhou Q., Xu Y., Chen C., Li Y. (2012). Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution* 171: 46-51
- Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F. (2009a). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157: 1636-1642
- Livermore D.M. (1990). Antibiotic uptake and transport by bacteria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 74(Suppl): 15-27.
- Loken K.I., Wagner L.W., Henke C.L. (1971). Transmissible drug resistance in Enterobacteriaceae isolated from calves given antibiotics. *American Journal of Veterinary Research* 32(8): 1207-1212.
- Long K.S., Poehlsgaard J., Kehrenberg C., Schwarz S., Vester B. (2006) The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols lincosamides oxazolidinones pleuromutilins and streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7: 2500-2505
- Mahipal S., Chaudhry M.A., Yadaka I.N.S., Sanyal S.C. (1992). The spectrum of antibiotic resistance in human and veterinary isolates of *Escherichia coli* collected from 1984-1986 in Northern India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 29(2): 159-168.
- Malmö, 2000. Primer Foro Ambiental Mundial. Malmö (Suecia), del 29 al 31 de mayo de 2000
- Marshall B., Tachinana C., Levy S.B. (1986). Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24: 835-840.
- Mateu de Antonio E.M., Martin M. (1995). In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Veterinary Microbiology* 45(1): 1-10.
- Mccormack R.C., Kaye D., Hook E.W. (1962). Resistance of group A streptococci to tetracycline. *New England Journal of Medicine* 267(7): 323-326.

- Mediavilla A., Azanza J.R., Honorato J. (2008). Macrólidos. Cetólidos. Lincosamidas. Tetraciclinas. Cloranfenicol. Otros antibióticos. En: *Farmacología Humana*. Florez, J., Araujo, J.A. y Mediavilla, A. (Eds), Elsevier Masson, Barcelona, pp.: 1251-1255.
- Méndez B., Tachibana C., Levy S. B. (1980). Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid* 3(2): 99-108.
- Mergeay M., Monchy S., Vallaey T., Auquier V., Benotmane A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Wattiez R. (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metalresponsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 385-410
- Mitscher L.A., Slateren. B., Sokoloski T.D. (1972). Circular-dichroism measurements of tetracyclines. IV. 5-hydroxylated derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2(2): 66-72.
- Morse S.A., Johnson S.R., Biddle J.W., Roberts M.C. (1986). High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30(5): 664-670.
- Naciones Unidas (1998). Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf> (último acceso 30/07/2015)
- Nairobi, 1997. Nairobi Declaration redefines and strengthens UNEP's role and mandate
- Nelson M.L., Park B.H., Levy S.B. (1994). Molecular requirements for the inhibition of the tetracycline antiport protein and the effect of potent inhibitors on the growth of tetracycline-resistant bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry* 37(9): 1355-1361.
- Nies D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339
- O'Connor S., Aga D.S. (2007). Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry* 26(6): 456-465
- OECD (1984). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests (1984)

- OECD (2000). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 217 Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test (2000).
- OECD (2006a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 Effects on Biotic Systems. ISSN: 2074-5761 (online) DOI :10.1787/20745761 Summary of Considerations in the Report from the OECD Expert Group on Ecotoxicology http://www.oecd-ilibrary.org/environment/summary-of-considerations-in-the-report-from-the-oecd-expert-group-on-ecotoxicology_9789264022386-en (último acceso 30/07/2015)
- OECD (2006b). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 Physical-Chemical properties. ISSN: 2074-5753 (online) DOI: 10.1787/20745753 Summary of Considerations in the Report from the OECD Expert Group on Physical Chemistry http://www.oecd-ilibrary.org/environment/summary-of-considerations-in-the-report-from-the-oecd-expert-group-on-physical-chemistry_9789264013391-en (ultimo acceso 30/07/2015)
- OECD (2006c). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (2006)
- OECD (2006d). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test (2006)
- O'hara K., Kono M. (1975). Mechanism of tetracycline resistance in *Pseudomonas aeruginosa* carrying an R factor. *The Journal of Antibiotics* 28(8): 607-608.
- Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Harada K., Ito S., Suzuki M. (1989). Photodecomposition products of tetracyclines in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 226-231
- Orden PRE/2833/2009, de 19 de octubre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente.
- Persson K.M., Forsgren A. (1986). Antimicrobial susceptibility of group B streptococci. *European Journal of Clinical Microbiology* 5(2): 165-167.

- Pijpers A., Vanklingeren B., Schoevers E. J., Verheijden J. H. M., Vanmiert A.S.J.P.A.M. (1989). In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory-tract pathogens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 12(3): 267-276.
- PNUMA (1972). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Carta Europea de los Suelos, aprobada por el Consejo de Europa en 1972, y la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano (1ª Conferencia del PNUMA, Estocolmo 1972)
- PNUMA (1982). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Política Mundial del Suelo
- Pomerantsev A.P., Shishkova N.A., Marinin L.I. (1992). Comparison of therapeutic effects of antibiotics of the tetracycline group in the treatment of anthrax caused by a strain inheriting tet-gene of plasmid pBC16. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 37(4): 31-34.
- Prescott J.F., Baggot J.D. (1991). Tetraciclinas. En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria*. Prescott, J.F. & Baggott J.D. (Eds.), Acribia, Zaragoza, pp. 225-239.
- Pro J., Ortiz J.A., Boleas S. Fernández C., Carbonell G., Tarazona J.V. (2003). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 290-295
- Rae D.O., Chenoweth P.J., Brown M.B., Genho P.C., Moore S.A., Jacobsen K.E. (1993). Reproductive performance of beef heifers: effects of vulvo-vaginitis, *Ureaplasma diversum* and prebreeding antibiotic administration. *Theriogenology* 40(3): 497-508.
- Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios.
- Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente.
- Roberts M.C. (1994). Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends of Microbiology* 2(10): 353-357.
- Roberts M.C., Hillier S.L., Hale J., Holmes K.K., Kenny G.E. (1986). Tetracycline resistance and tetM in pathogenic urogenital bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30(5): 810-812.

- Rogers J.E., Li S.W. (1985). Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity: soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 34: 858–865.
- Römbke J., Aira M., Backeljau T., Breugelmans K., Domínguez J., Funke E., Graf N., Hajibabaei M., Perez-Losada M., Pfenninger M., Porto P.G., Schmelz R.M., Vierna J., Vizcaíno A.(2014). Genetic methods to characterize test species in ecotoxicology: The Eisenia Barcoding Initiative (EBI). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). <http://www.minhobox.com.br/Roembke-EBI-SETAC-2014-PS.pdf> (último acceso 15/10/2015)
- Roth H.J., Eger K., Troschütz R. (1991). Polycarbocyclics. In: *Pharmaceutical Chemistry II. Drug Analysis*. Roth, H.J., Eger, K. & Troschütz, R. (Eds.), Ellis Horwood, London, England: pp.451-458.
- Rothstein D.M., McGlynn M., Bernan V., McGahren J., Zaccardi J., Cekleniak N., Bertrand K.P. (1993). Detection of tetracyclines and efflux pump inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(8): 1624-1629.
- Rylander M., Hallander H.O. (1988). Invitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, Cp-62993, against *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 53(Suppl): 12-17.
- Santos L.H., Araújo A., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175: 45-95
- Sarkar S., Thach R.E. (1968). Inhibition of formylmethionyl-transfer RNA binding to ribosomes by tetracycline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60(4): 1479-1486.
- Sasaki Y., Yamamoto K., Tamura Y., Takahashi T. (2001). Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology* 83(1): 61-69.
- Schirmer K., Fischer B.B., Madureira D.J., Pillai S. (2010). Transcriptomics in ecotoxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397(3): 917-923

- Sengeløv G., Halling-Sorensen B., Aarestrup F.M. (2003). Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Veterinary Microbiology* 95(1-2): 91-101.
- Smith H.W. (1975). Persistence of tetracycline resistance in pig *E. coli*. *Nature* 258: 628-630.
- Smith H.W., Crabb W.E. (1957). The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracycline on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of the *Bacterium coli* to other chemotherapeutic agents. *Veterinary Record* 12: 24-30.
- Smith H.W., Lovell M.A. (1981). *Escherichia coli* resistant to tetracyclines and to other antibiotics in the faeces of U.K. chickens and pigs in 1980. *Journal of Hygiene* 87(3): 477-483
- Someya Y., Yamaguchi A., Sawai T. (1995). A novel glycylicycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline, is neither transported nor recognized by the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(1): 247-249.
- Spaepen K.R.I., Van Leemput L.J.J., Wislocki P.G., Verschueren C. (1997). A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(9): 1977-1982.
- Sparling P.F., Sarubbi F.A. Jr., Blackman E. (1975). Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology* 124(2): 740-749.
- Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers, A.A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews* 5(4): 387-399.
- Spooner P.R. (1990). The effects of oxytetracycline on *Theileria parva* in vitro. *Parasitology* 100(1): 11-17.

- Steigbigel N.H., Reed C.W., Finland M. (1968). Susceptibility of common pathogenic bacteria to seven tetracycline antibiotics in vitro. *American Journal of the Medical Sciences* 255: 179-195.
- Stockholms Läns Landsting. (2012). Environmentally Classified Pharmaceuticals.
- Suzuka I., Kaji H., Kaji A. (1966). Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effect of 50S ribosomal subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55(6): 1483-1490.
- Taraldsen J.E-, Norbert-King TJ (1990). New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 761-767
- Tritton T.R. (1977). Ribosome-tetracycline interactions. *Biochemistry* 16(18): 4133-4138.
- Truhaut R. (1977). Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1: 151-173
- USGS (United States Geological Survey) (2015). Veterinary Medicines in the Environment. http://toxics.usgs.gov/highlights/vet_meds.html (último acceso 08/10/2015)
- Voskresenskii A.M., Belokhvostov A.S., Sidorenko S.V., Lebedeva I.K., Kozlova N.S. (1991). Detection of the determinants of tetracycline A, B and C resistance in *Shigella* and *Salmonella* using DNA probes. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 36(7): 17-19.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. (1996). Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis Ltd. ISBN 0-7484-0220-9.
- Wang W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution, Ser B* 11:1-14
- Wang W. (1990a). Toxicity assessment of pretreated industrial effluents using higher plants (common duckweed, lettuce and rice). *Journal Water Pollution Control Federation* 62: 853-86
- Wang W. (1990b). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52:7-22
- Wang W., Williams J. (1988). Screening and biomonitoring of industrial effluents using phytotoxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 761-767

- Wang W., Williams J. (1990). The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment* 14: 45-58
- Winckler C., Grafe A. (2001). Use of veterinary drugs in intensive animal production. Evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments* 1(2): 66-70
- Yamaguchi A., Ohmori H., Kaneko-Ohdera M., Nomura T., Sawai T. (1991). Delta pH-dependent accumulation of tetracycline in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(1): 53-56.
- Yamamoto K., Koshimizu K., Ogata M. (1986). In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. *Japanese Journal of Veterinary Science* 48(1): 1-5.
- Yamaoka F., Nakagawa T., Uno T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 6(2): 165-75.
- Yoshimura H., Ishimaru M., Endoh Y.S., Kojima A. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48(7): 555-560.
- Zhou Q.X., Luo Y., Wang X.R., Wang M.E. (2007). Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: a review. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2: 243-251.
- Zhu Y.G. (2009). Soil science in the understanding of the security of food consumer system for health. *Asia Pacific Journal of clinical nutrition* 18: 516-519